



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 199 01 761 A 1**

51 Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/11
C 12 Q 1/68
C 07 H 21/00
G 01 N 27/26

21 Aktenzeichen: 199 01 761.1
22 Anmeldetag: 18. 1. 99
43 Offenlegungstag: 1. 7. 99

DE 199 01 761 A 1

Mit Einverständnis des Anmelders offengelegte Anmeldung gemäß § 31 Abs. 2 Ziffer 1 PatG

71 Anmelder:
Hartwich, Gerhard, Dr., 80639 München, DE

72 Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen

57 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur elektrochemischen Detektion von sequenzspezifischen Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen. Dabei dienen DNA-/RNA-/PNA-Oligomer-Einzelstränge, die mit einem Ende an einer leitfähigen Oberfläche gebunden und am anderen, freien Ende mit einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit verknüpft sind, als Hybridisierungsmatrix (Probe). Durch Behandlung mit der zu untersuchenden Oligonukleotid-Lösung (Target) wird ein Teil der Einzelstrang-Oligonukleotide hybridisiert, wodurch die ursprünglich nicht oder nur schwach vorhandene elektrische Kommunikation zwischen der leitfähigen Oberfläche und der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit erhöht wird. Somit wird die Detektion eines Hybridisierungsergebnisses durch elektrochemische Verfahren wie Voltammetrie, Amperometrie oder Leitfähigkeitsmessung ermöglicht.

DE 199 01 761 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer, sowie ein Verfahren zur elektrochemischen Detektion von sequenzspezifischen Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen.

Stand der Technik

Zur Sequenzanalyse von DNA und RNA, z. B. in der Krankheitsdiagnose, bei toxikologischen Testverfahren, in der genetischen Forschung und Entwicklung, sowie auf dem Agrar- und pharmazeutischen Sektor, werden im allgemeinen gel-elektrophoretische Verfahren mit autoradiographischer oder optischer Detektion verwendet.

Beim wichtigsten gel-elektrophoretischen Verfahren mit optischer Detektion, dem Sanger-Verfahren wird eine DNA enthaltende Lösung in vier Ansätze aufgeteilt. Zur Unterscheidung der vier Ansätze ist der Primer (komplementäre Startsequenz zur Replikation) jedes Ansatzes mit je einem bei verschiedener Wellenlänge emittierenden Fluoreszenzfarbstoff kovalent modifiziert. Ausgehend vom Primer wird jeder Ansatz durch DNA-Polymerase I enzymatisch repliziert. Neben den dazu nötigen Desoxyribonucleosid-Triphosphaten der Basen A (Adenin), T (Thymin), C (Cytosin), und G (Guanin) enthält jedes Reaktionsgemisch noch genügend 2',3'-Dideoxynalogon eines dieser Nukleosidtriphosphate als Stopbase (je eine der 4 möglichen Stopbasen pro Ansatz), um die Replikation an allen möglichen Bindungsstellen zu stoppen. Nach Vereinigung der vier Ansätze entstehen replizierte DNA-Fragmente aller Längen mit stopbasenspezifischer Fluoreszenz, die gel-elektrophoretisch der Länge nach sortiert und durch Fluoreszenz-Spektroskopie charakterisiert werden können.

Ein anderes optisches Detektionsverfahren basiert auf der Anlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen wie z. B. Ethidiumbromid an Oligonukleotide. Im Vergleich zur freien Lösung des Farbstoffs ändert sich die Fluoreszenz solcher Farbstoffe bei Assoziation mit doppelsträngiger DNA oder RNA drastisch und kann deshalb zum Nachweis hybridisierter DNA oder RNA verwendet werden.

Bei der radioaktiven Markierung wird ^{32}P in das Phosphatgerüst der Oligonukleotide eingebaut, wobei ^{32}P gewöhnlich am 5'-Hydroxylende durch Polynukleotid-Kinase addiert wird. Die markierte DNA wird anschließend an jeweils einem der vier Nukleotidtypen bevorzugt gespalten und zwar unter definierten Bedingungen, so daß pro Kette durchschnittlich eine Spaltung erfolgt. Damit liegen im Reaktionsgemisch für einen bestimmten Basentyp Ketten vor, die sich von der ^{32}P -Markierung bis zur Position dieser Base erstrecken (bei mehrfachem Auftreten der Base erhält man entsprechend Ketten unterschiedlicher Länge). Die vier Fragmentgemische werden anschließend auf vier Bahnen gel-elektrophoretisch aufgetrennt und es wird vom Gel ein Autoradiogramm angefertigt, an dem die Sequenz unmittelbar abgelesen werden kann.

Vor einigen Jahren wurde ein weiteres, auf optischer (oder autoradiographischer) Detektion beruhendes Verfahren zur DNA-Sequenzierung entwickelt, nämlich die Sequenzierung durch Oligomer-Hybridisierung (vgl. z. B. Drmanac et al., Genomics 4, (1989), S. 114-128 oder Bains et al., Theor. Biol. 135, (1988), S. 303-307). Bei diesem Verfahren wird ein vollständiger Satz kurzer Oligonukleotide bzw. Nukleinsäure-Oligomere (Probe-Oligonukleotide), z. B. alle 65.536 möglichen Kombinationen der Basen A, T, C und G eines Oligonukleotid-Oktamers auf ein Trägermaterial gebunden. Die Anbindung geschieht in einem geordneten Raster aus 65.536 Test-Sites, wobei jeweils eine größere Menge einer Oligonukleotid-Kombination ein Test-Site definieren und die Position jeder einzelnen Test-Site (Oligonukleotid-Kombination) bekannt ist. Auf solch einer Hybridisierungsmatrix, dem Oligomer-Chip, wird ein DNA-Fragment, dessen Sequenz man ermitteln will (das Target), mit Fluoreszenzfarbstoff (oder ^{32}P) markiert und unter Bedingungen, die nur eine spezifische Doppelstrangbildung erlauben, hybridisiert. Dadurch bindet das Target DNA-Fragment nur an die Nukleinsäure-Oligomere (im Beispiel an die Oktamere), deren komplementäre Sequenz exakt einem Teil (einem Oktamer) seiner eigenen Sequenz entspricht. Durch optische (oder autoradiographische) Detektion der Bindungsposition des hybridisierten DNA-Fragments werden damit alle im Fragment vorhandenen Nukleinsäure-Oligomersequenzen (Oktamersequenzen) bestimmt. Aufgrund der Überlappung benachbarter Nukleinsäure-Oligomersequenzen kann durch geeignete mathematische Algorithmen die fortlaufende Sequenz des DNA-Fragments bestimmt werden. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen unter anderem in der Miniaturisierung der Sequenzierung und damit in der enormen Datenmenge, die gleichzeitig in einem Arbeitsgang erfaßt wird. Daneben kann auf Primer und auf das gel-elektrophoretische Auftrennen der DNA-Fragmente verzichtet werden. Beispielhaft ist dieses Prinzip in Fig. 1 für ein 13 Basen langes DNA-Fragment gezeigt.

Die Verwendung radioaktiver Markierungen bei der DNA-/RNA-Sequenzierung ist mit mehreren Nachteilen verbunden, wie z. B. aufwendige, gesetzlich vorgeschriebene Sicherheitsvorkehrungen beim Umgang mit radioaktiven Materialien, die Strahlenbelastung, das begrenzte räumliche Auflösungsvermögen (maximal 1 mm^2) und eine Sensitivität, die nur dann hoch ist, wenn die Strahlung der radioaktiven Fragmente entsprechend lange (Stunden bis Tage) auf einen Röntgenfilm einwirkt. Es kann zwar die räumliche Auflösung durch zusätzliche Hard- und Software erhöht und die Detektionszeit durch die Verwendung von β -Scannern verkürzt werden, beides ist jedoch mit erheblichen zusätzlichen Kosten verbunden.

Die Fluoreszenzfarbstoffe, die üblicherweise zur Markierung der DNA verwendet werden, sind zum Teil (z. B. Ethidiumbromid) mutagen und erfordern, ebenso wie die Anwendung der Autoradiographie, entsprechende Sicherheitsvorkehrungen. In fast allen Fällen erfordert die Verwendung optischer Detektion den Gebrauch von einem oder mehreren Lasersystemen und somit geschultes Personal und entsprechende Sicherheitsvorkehrungen. Die eigentliche Detektion der Fluoreszenz erfordert zusätzliche Hardware, wie z. B. optische Bauelemente zur Verstärkung und, bei verschiedenen Anregungs- und Abfragewellenlängen wie im Sanger-Verfahren, ein Kontrollsystem. Abhängig von den benötigten Anregungswellenlängen und der gewünschten Detektionsleistung können somit erhebliche Investitionskosten entstehen. Bei der Sequenzierung durch Hybridisierung auf dem Oligomer-Chip ist die Detektion noch (kosten)aufwendiger, da, neben dem Anregungssystem, zur 2-dimensionalen Detektion der Fluoreszenzspots hochauflösende CCD-Kameras

(Charge Coupled Device Kameras) benötigt werden.

Obwohl es also quantitative und extrem sensitive Methoden zur DNA-/RNA-Sequenzierung gibt, sind diese Methoden zeitaufwendig, bedingen aufwendige Probenpräparation und teure Ausstattung und sind im allgemeinen nicht als transportable Systeme verfügbar.

Darstellung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden zu schaffen, welche die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweisen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer gemäß unabhängigem Patentanspruch 1, durch das Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers gemäß unabhängigem Patentanspruch 16, durch die modifizierte leitfähige Oberfläche gemäß unabhängigem Patentanspruch 22, das Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche gemäß unabhängigem Patentanspruch 35 und ein Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen gemäß unabhängigen Patentanspruch 38 gelöst.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Abkürzungen und Begriffe benutzt:

Genetik

DNA: Desoxyribonukleinsäure

RNA: Ribonukleinsäure

PNA: Peptidnukleinsäure (synthetische DNA oder RNA, bei der die Zucker-Phosphat Einheit durch eine Aminosäure ersetzt ist. Bei Ersatz der Zucker-Phosphat Einheit durch die $-NH-(CH_2)_2-N(COCH_2\text{-Base})-CH_2CO\text{-}$ Einheit hybridisiert PNA mit DNA).

A: Adenin

G: Guanin

C: Cytosin

T: Thymin

U: Uracil

Base: A, G, T, C oder U

Bp: Basenpaar

Nukleinsäure: wenigstens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundenen Pyrimidin- (z. B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z. B. Adenin oder Guanin). Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z. B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Strukturen (z. B. Phosphorimid-, Phosphorothioat- oder Phosphorodithioat-Rückgrat).

Nukleinsäure-Oligomer: Nukleinsäure nicht näher spezifizierter Basenlänge (z. B. Nukleinsäure-Oktamer: eine Nukleinsäure mit beliebigem Rückgrat, bei dem 8 Pyrimidin- oder Purin-Basen kovalent aneinander gebunden sind).

Oligomer: Äquivalent zu Nukleinsäure-Oligomer.

Oligonukleotid: Äquivalent zu Oligomer oder Nukleinsäure-Oligomer, also z. B. ein DNA, PNA oder RNA Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.

Oligo: Abkürzung für Oligonukleotid.

Primer: Start-Komplementär-Fragment eines Oligonukleotids, wobei die Basenlänge des Primers nur ca. 4-8 Basen beträgt. Dient als Ansatzpunkt für die enzymatische Replikation des Oligonukleotids.

Mismatch: Zur Ausbildung der Watson Crick Struktur doppelsträngiger Oligonukleotide hybridisieren die beiden Einzelstränge derart, daß die Base A (bzw. C) des einen Strangs mit der Base T (bzw. G) des anderen Strangs Wasserstoffbrücken ausbildet (bei RNA ist T durch Uracil ersetzt). Jede andere Basenpaarung bildet keine Wasserstoffbrücken aus, verzerrt die Struktur und wird als "Mismatch" bezeichnet.

ss: single strand (Einzelstrang)

ds: double strand (Doppelstrang)

Photoinduzierbar redoxaktive Einheiten

Elektron-Donor: Molekül (oder Molekülteil), das unmittelbar oder nach Einwirkung bestimmter äußerer Umstände ein Elektron an einen Elektron-Akzeptor transferieren kann. Besagte äußere Umstände können z. B. Lichtabsorption durch den Elektron-Donor oder -Akzeptor sein oder Übertragung eines Elektrons auf den Elektron-Donor bzw. Abgabe eines Elektrons durch den Elektron-Akzeptor. Die Fähigkeit als Elektron-Donor oder -Akzeptor zu wirken ist relativ, d. h. ein Molekül (oder Molekülteil), das unmittelbar oder nach Einwirkung bestimmter äußerer Umstände gegenüber einem anderen Molekül (oder Molekülteil) als Elektron-Donor wirkt, kann gegenüber besagtem anderen Molekül (oder Molekülteil) unter anderen experimentellen Bedingungen oder gegenüber einem dritten Molekül (Molekülteil) unter gleichen oder anderen experimentellen Bedingungen auch als Elektron-Akzeptor wirken.

Elektron-Akzeptor: Molekül (oder Molekülteil), das unmittelbar oder nach Einwirkung bestimmter äußerer Umstände ein Elektron von einem Elektron-Donor aufnehmen kann. Besagte äußere Umstände können z. B. Lichtabsorption durch den Elektron-Akzeptor oder -Donor sein oder Abgabe eines Elektrons durch den Elektron-Akzeptor bzw. Übertragung eines Elektrons auf den Elektron-Donor. Die Fähigkeit als Elektron-Akzeptor oder -Donor zu wirken ist relativ, d. h. ein Molekül (oder Molekülteil), das unmittelbar oder nach Einwirkung bestimmter äußerer Umstände gegenüber einem anderen Molekül (oder Molekülteil) als Elektron-Akzeptor wirkt, kann gegenüber besagtem anderen Molekül (oder Molekülteil) unter anderen experimentellen Bedingungen oder gegenüber einem dritten Molekül (Molekülteil) unter gleichen

oder anderen experimentellen Bedingungen auch als Elektron-Donor wirken.

Elektron-Donor-Molekül(teil): entspricht einem Elektron-Donor.

Elektron-Akzeptor-Molekül(teil): entspricht einem Elektron-Akzeptor.

photoinduzierbar: photoinduzierbar bedeutet, daß eine gewisse Eigenschaft erst durch Einstrahlen von Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge entfaltet wird. So entfaltet z. B. eine photoinduzierbar redoxaktive Einheit ihre Redoxaktivität, also ihre Eigenschaft, unter bestimmten äußeren Umständen an einen geeigneten Elektron-Akzeptor Elektronen abzugeben oder von einem geeigneten Elektron-Donor Elektronen aufzunehmen, erst durch Einstrahlen von Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge. Ein weiteres Beispiel ist die photoinduzierbar reaktive Gruppe, d. h. eine Gruppe, die erst durch Einstrahlen von Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge reaktiv wird.

redoxaktiv: redoxaktiv bezeichnet die Eigenschaft einer redoxaktiven Einheit oder Substanz unter bestimmten äußeren Umständen an einen geeigneten Elektron-Akzeptor Elektronen abzugeben oder von einem geeigneten Elektron-Donor Elektronen aufzunehmen.

photoinduzierbar redoxaktive Einheit: Oberbegriff für eine Einheit, die ein oder mehrere Elektron-Donor-Moleküle oder -Molekülteile und ein oder mehrere Elektron-Akzeptor-Moleküle oder -Molekülteile enthält, wobei dieses (diese) Elektron-Donor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) und dieses (diese) Elektron-Akzeptor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) in

ein oder mehrere Makromoleküle eingebettet sein können. Die photoinduzierbar redoxaktive Einheit kann z. B. jedes beliebige photoinduzierbar redoxaktive Protein/Enzym, jeder beliebige photoinduzierbar redoxaktive, kovalent verknüpfte, wenigstens bimolekulare Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplex oder jeder beliebige photoinduzierbar redoxaktive Charge-Transfer-Komplex sein. Durch Einstrahlung von Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge gibt der

Elektron-Donor an einen der Elektron-Akzeptoren ein Elektron ab und es bildet sich, zumindest temporär, ein ladungsgetrennter Zustand D^+A^- aus oxidiertem Donor und reduziertem Akzeptor. Dieser Vorgang innerhalb der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit wird als photoinduzierte Ladungstrennung bezeichnet. Bei entsprechend gewählten äußeren Umständen entfaltet die photoinduzierbar redoxaktive Einheit ihre Redoxaktivität, also ihre Eigenschaft, an einen geeigneten externen Elektron-Akzeptor Elektronen abzugeben oder von einem geeigneten, externen Elektron-Donor Elektronen aufzunehmen, erst im ladungsgetrennten Zustand, da die externen Donoren (bzw. Akzeptoren) nur auf den oxidierten Donor (bzw. vom reduzierten Akzeptor) der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit Elektronen übertragen (bzw. aufnehmen), z. B. in Gegenwart eines externen Oxidationsmittels, das A^- , jedoch nicht A, oxidieren kann (bzw. in Gegenwart eines Reduktionsmittels, das D^+ , jedoch nicht D, reduziert kann). Auch kann eine photoinduzierbar redoxaktive Einheit erst nach der photoinduzierten Ladungstrennung ein Elektron an eine Elektrode abgeben (bzw. von dieser aufnehmen), wenn die Elektrode auf ein Potential gesetzt wird, bei dem A^- , jedoch nicht A, oxidiert (bzw. D^+ , jedoch nicht D, reduziert) wird.

photoinduzierbar redoxaktives Protein/Enzym: besteht in der Regel aus Apoprotein und Cofaktoren. Die photoinduzierte Ladungstrennung innerhalb des photoaktivierbaren redoxaktiven Proteins/Enzyms wird durch Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge ausgelöst. So sind zum Beispiel im photosynthetischen Reaktionszentrum (reaction center, RC) als Cofaktoren ein primärer Elektron-Donor P und mehrere verschiedene Elektron-Akzeptoren A, darunter auch Quinon-Cofaktor(en) Q, in eine Proteinmatrix eingebettet und bilden so eine "polymolekulare" Einheit. Bei Lichteinstrahlung geeigneter Wellenlänge gibt der primäre Donor ein Elektron an einen der Elektron-Akzeptoren ab und es bildet sich, zumindest temporär, aus den anfänglich neutralen Cofaktoren ein ladungsgetrennter RC-Zustand P^+A^- , insbesondere auch der Zustand P^+Q^- .

photoinduzierbar redoxaktiver, kovalent verknüpfter, (wenigstens bimolekularer) Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplex: kovalent verknüpfte Verbindung aus einem oder mehreren Elektron-Donor Molekülen D1, D2, D3 etc. und mindestens einem oder mehreren geeigneten Elektron-Akzeptor Molekülen A1, A2, A3 etc., wobei der Fachmann anhand der Struktur des Elektron-Donor-/Akzeptor-Komplexes den Aufbau aus den ursprünglichen Molekülen zu erkennen vermag. Die auch als Einzelmoleküle vorkommenden Bestandteile D1, D2, D3 etc. und A1, A2, A3 etc. sind im

Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplex direkt oder indirekt (z. B. über einen Spacer, nicht aber über ein Nukleinsäure-Oligomer) miteinander verbunden. Der photoinduzierbar redox-aktive, kovalent verknüpfte, (wenigstens bimolekulare) Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplex entspricht in seiner erfindungsrelevanten Funktionsweise einem photoinduzierbar redoxaktiven Protein/Enzym, d. h. auch hier kommt es durch Lichteinstrahlung geeigneter Wellenlänge zur photoinduzierten Ladungstrennung und es wird, zumindest temporär, ein ladungsgetrennter Zustand D^+A^- gebildet (wobei D für ein beliebiges D1, D2, D3 etc. und A für ein beliebiges A1, A2, A3 etc. steht).

photoinduzierbar redoxaktiver Charge-Transfer-Komplex: elektrisch geladener oder ungeladener Komplex $[M(L1)(L2)(L3)etc.]$ aus Übergangsmetall M und Liganden L1, L2, L3 etc., bei dem Lichtanregung zu einem intramolekularen Ladungstrennungsprozeß führt. Der photoinduzierbar redoxaktive Charge-Transfer-Komplex entspricht in seiner erfindungsrelevanten Funktionsweise einem photoaktivierbaren redoxaktiven Protein/Enzym, d. h. auch hier kommt es durch Lichteinstrahlung geeigneter Wellenlänge zur photoinduzierten Ladungstrennung. Dabei wird ein Elektron von einem Liganden L zum Metall M transferiert und der ladungsgetrennte Zustand M^+L^- gebildet oder es wird ein Elektron vom Metall M zu einem Ligand L transferiert und der ladungsgetrennte Zustand M^+L^- entsteht.

RC: Reaktionszentrum. Beispiel eines photoinduzierbar redoxaktiven Proteins/Enzyms. Bei dem Protein/Enzym handelt es sich um einen sogenannten Pigment/Protein-Komplex der aus Apoprotein mit mehreren Proteinuntereinheiten und mehreren Cofaktoren (im Beispiel RC sogenannte Pigmente) handelt. In solchen Pigment/Protein-Komplexen spielen sich die ersten Schritte der lichtgetriebenen Ladungstrennung der bakteriellen oder pflanzlichen Photosynthese ab. Das RC der Photosynthese betreibenden Bakterien des Stammes Rhodobacter sphaeroides z. B. besteht aus drei Protein-Untereinheiten und acht Cofaktoren (Pigmenten). Die Cofaktoren sind ein Bakteriochlorophyll-Dimer P, zwei Bakteriochlorophyll-Monomere B_A und B_B , zwei Bakteriopheophytin-Monomere H_A und H_B und zwei Ubichinon-50 (UQ) Moleküle Q_A und Q_B , die in den jeweiligen Protein-Bindungstaschen (also der P-, B_A - etc. Bindungstasche) lokalisiert sind (vgl. Struktur 1).

Q_A -Protein-Bindungstasche: Proteinbindungstasche bzw. Proteinumgebung in der sich der Chinon-Cofaktor Q_A befindet. In RC von z. B. Rhodobacter sphaeroides ist der Chinon-Cofaktor Q_A ein Ubichinon-50 (vgl. Struktur 1).

Q_A-Bindungstasche: Q_A-Protein-Bindungstasche

freie, redoxaktive Substanz: eine nicht an ein Nukleinsäure-Oligomer gebundene, aber mit dem Nukleinsäure-Oligomer in Kontakt stehende, redoxaktive Substanz, wobei diese Substanz z. B. ein ungeladenes Molekül, eine beliebiges Salz oder ein redoxaktives Protein oder Enzym (Oxydoreductase) sein kann. Die freie redoxaktive Substanz ist dadurch gekennzeichnet, daß sie den oxidierten Donor (bzw. den reduzierten Akzeptor) der photoinduzierbar redoxaktive Einheit re-reduzieren (bzw. re-oxidieren) kann.

Chemische Substanzen/Gruppen

ZnBChl: Zn-Bakteriochlorophyll (Formel 11 mit M = Zn)

Q: allgemein für Chinon (engl. Quinone), im Beispiel 3 und den sich darauf beziehenden Textpassagen ein modifiziertes Anthrachinon oder Pyrrolochinolinchinon (PQQ).

UQ: Ubichinon-50, RC-Cofaktor und temporärer Elektron-Akzeptor z. B. im RC der Photosynthese betreibenden Bakterien aus z. B. Rhodobacter sphaeroides oder Rhodospseudomonas viridis.

(cyt c₂)²⁺: reduzierte Form des Cytochrom c₂, ein frei bewegliches Häm-Protein, das in der bakteriellen Photosynthese in Rhodobacter sphaeroides den oxidierten primären Donor P⁺ zu P reduziert; Beispiel einer redoxaktiven Substanz.

PQQ: Pyrrolo-Chinolono-Chinon, 4,5-Dihydro-4,5-dioxo-1H-pyrrolo-[2,3-f]-chinolin-2,7,9-tricarboxylsäure

EDTA: Ethylendiamin-Tetraacetat (Natriumsalz)

sulfo-NHS: N-Hydroxysulfosuccinimid

EDC: (3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid

HEPES: N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]

Tris: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

bipy: bispyridyl-Ligand

py: pyridyl-Ligand

im: imidazol-Ligand

Alkyl: Der Begriff "Alkyl" bezeichnet eine gesättigte Kohlenwasserstoffgruppe, die geradkettig oder verzweigt ist (z. B. Ethyl, 2,5-Dimethylhexyl oder Isopropyl etc.). Wenn "Alkyl" benutzt wird, um auf einen Linker oder Spacer zu verweisen, bezeichnet der Begriff eine Gruppe mit zwei verfügbaren Valenzen für die kovalente Verknüpfung (z. B. -CH₂CH₂-, -CH₂C(CH₃)₂CH₂CH₂C(CH₃)₂CH₂- oder -CH₂CH₂CH₂- etc.). Bevorzugte Alkylgruppen als Substituenten oder Seitenketten R sind solche der Kettenlänge 1–30 (längste durchgehende Kette von kovalent aneinander gebundenen Atomen). Bevorzugte Alkylgruppen als Linker oder Spacer sind solche der Kettenlänge 1–20, insbesondere der Kettenlänge 1–14, wobei die Kettenlänge hier die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen, also zwischen den zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül, darstellt.

Alkenyl: Alkylgruppen, bei denen eine oder mehrere der C-C Einfachbindungen durch C=C Doppelbindungen ersetzt sind.

Alkynyl: Alkyl- oder Alkenylgruppen, bei denen eine oder mehrere der C-C Einfach- oder C=C Doppelbindungen durch C≡C Dreifachbindungen ersetzt sind.

Hetero-Alkyl: Alkylgruppen, bei denen eine oder mehrere der C-H Bindungen oder C-C Einfachbindungen durch C-N, C=N, C-P, C=O, C=S oder C≡S Bindungen ersetzt sind.

Hetero-Alkenyl: Alkenylgruppen, bei denen eine oder mehrere der C-H Bindungen, C-C Einfach- oder C=C Doppelbindungen durch C-N, C=N, C-P, C=O, C=S oder C≡S Bindungen ersetzt sind.

Hetero-Alkynyl: Alkynylgruppen, bei denen eine oder mehrere der C-H Bindungen, C-C Einfach-, C=C Doppel- oder C≡C Dreifachbindung durch C-N, C=N, C-P, C=O, C=S oder C≡S Bindungen ersetzt sind.

Linker: molekulare Verbindung zwischen zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül. In der Regel sind Linker als Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Hetero-Alkyl-, Hetero-Alkenyl- oder Heteroalkynylkette käuflich zu erwerben, wobei die Kette an zwei Stellen mit (gleichen oder verschiedenen) reaktiven Gruppen derivatisiert ist. Diese Gruppen bilden in einfachen/bekannten chemischen Reaktionen mit den entsprechenden Reaktionspartner eine kovalente chemische Bindung aus. Die reaktiven Gruppen können auch photoaktivierbar sein, d. h. die reaktiven Gruppen werden erst durch Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge aktiviert. Bevorzugte Linker sind solche der Kettenlänge 1–20, insbesondere der Kettenlänge 1–14, wobei die Kettenlänge hier die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen, also zwischen den zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül, darstellt.

Spacer: Linker, der über die reaktiven Gruppen an eine oder beide der zu verbindenden Strukturen (siehe Linker) kovalent angebunden ist. Bevorzugte Spacer sind solche der Kettenlänge 1–20, insbesondere der Kettenlänge 1–14, wobei die Kettenlänge die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen darstellt.

Modifizierte Oberflächen/Elektroden

Mica: Muskovit-Plättchen, Trägermaterial zum Aufbringen dünner Schichten.

Au-S-(CH₂)₇-ss-oligo-Spacer-UQ(RC): Gold-Film auf Mica mit kovalent aufgebrachter Monolayer aus derivatisiertem 12Bp Einzelstrang DNA-Oligonukleotid (Sequenz: TAGTCGGAAGCA). Hierbei ist die endständige Phosphatgruppe des Oligonukleotids am 3'-Ende mit (HO-(CH₂)₇-S)₂ zum P-O-(CH₂)₇-S-S-(CH₂)₇-OH verestert, wobei die S-S Bindung homolytisch gespalten wird und je eine Au-S-R Bindung bewirkt. Die endständige Base Thymin am 5'-Ende des Oligonukleotids ist am C-5 Kohlenstoff mit -CH=CH-CO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ modifiziert und dieser Rest wiederum ist über seine freie Aminogruppe durch Amidbildung mit der Carbonsäuregruppe des modifizierten Ubichinon-50 verbunden und anschließend mit dem restlichen RC rekonstituiert.

Au-S-(CH₂)₂-ds-oligo-Spacer-UQ(RC): Au-S-(CH₂)₂-ss-oligo-Spacer-UQ(RC) hybridisiert mit dem zu ss-oligo (Sequenz: TAGTCGGAAGCA) komplementären Oligonukleotid.

Au-S-(CH₂)₂-ss-oligo-Spacer-Q-ZnBChl: identisch zu Au-S-(CH₂)₂-ds-oligo-Spacer-UQ(RC) mit der Ausnahme, daß, statt des über UQ angebundenen RCs, Q-ZnBChl als photoinduzierbar redoxaktive Einheit angebunden ist.

5 Au-S-(CH₂)₂-ds-oligo-Spacer-Q-ZnBChl: Au-S-(CH₂)₂-ss-oligo-Spacer-Q-ZnBChl hybridisiert mit dem ss-oligo (Sequenz: TAGTCGGAAGCA) komplementären Oligonukleotid.

Elektrochemie

10 E: Elektrodenpotential, das an der Arbeitselektrode anliegt.

E_{ox}: Potential beim Strom-Maximum der Oxidation einer reversiblen Elektrooxidation oder -reduktion.

i: Stromdichte (Strom pro cm² Elektrodenoberfläche)

Cyclovoltametrie: Aufzeichnung einer Strom/Spannungskurve. Hierbei wird das Potential einer stationären Arbeitselektrode zeitabhängig linear verändert, ausgehend von einem Potential, bei dem keine Elektrooxidation oder -reduktion
15 stattfindet bis zu einem Potential, bei dem eine gelöste oder an die Elektrode adsorbierte Spezies oxidiert oder reduziert wird (also Strom fließt). Nach Durchlaufen des Oxidations- bzw. Reduktionsvorgangs, der in der Strom/Spannungskurve einen zunächst ansteigenden Strom und nach Erreichen eines Maximums einen allmählich abfallenden Strom erzeugt, wird die Richtung des Potentialvorschubs umgekehrt. Im Rücklauf wird dann das Verhalten der Produkte der Elektro-
oxidation oder -reduktion aufgezeichnet.

20 Amperometrie: Aufzeichnung einer Strom/Zeitkurve. Hierbei wird das Potential einer stationären Arbeitselektrode z. B. durch einen Potentialsprung auf ein Potential gesetzt, bei dem die Elektrooxidation oder -reduktion einer gelösten oder adsorbierten Spezies stattfindet und der fließende Strom wird in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäure-Oligomer, das durch chemische Bindung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit modifiziert ist, wobei die photoinduzierbar redoxaktive Einheit nach Abgabe oder Aufnahme eines
25 Elektrons an einen externen Elektron-Donor oder Elektron-Akzeptor, z. B. eine Elektrode, durch eine freie redoxaktive Substanz re-reduziert bzw. re-oxidiert, also in seinen ursprünglichen Zustand zurückversetzt werden kann.

Als Nukleinsäure-Oligomer wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Verbindung aus wenigstens zwei kovalent verbundenen Nukleotiden oder aus wenigstens zwei kovalent verbundenen Pyrimidin- (z. B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z. B. Adenin oder Guanin), bevorzugt ein DNA-, RNA- oder PNA-Fragment, verwendet. In
30 der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Begriff Nukleinsäure auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z. B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Rückgrat-Strukturen, wie z. B. ein Phosphorothioat-, ein Phosphorodithioat- oder ein Phosphoramid-Rückgrat. Alternativ zu dem Begriff "Nukleinsäure-Oligomer" werden die Begriffe "(Probe-) Oligonukleotid", "Nukleinsäure" oder "Oligomer" verwendet.

35 Unter einer "photoinduzierbar redoxaktiven Einheit" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung jede Einheit verstanden, die einen oder mehrere Elektron-Donor-Moleküle oder -Molekülteile und einen oder mehrere Elektron-Akzeptor-Moleküle oder -Molekülteile enthält. Die Elektron-Donor-Molekül(e) oder Molekülteil(e) und Elektron-Akzeptor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) dieser photoinduzierbar redoxaktiven Einheit können untereinander durch eine oder mehrere kovalente oder ionische Bindungen, durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen, van-der-Waals-Brücken, durch π -
40 π -Wechselwirkung oder durch Koordination mittels Elektronenpaar-Donation und -Akzeption miteinander verbunden sein. Außerdem können die Elektron-Donor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) und Elektron-Akzeptor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) in ein oder mehrere Makromolekül(e) eingebunden sein, wobei diese Einbindung durch Einkapseln in molekulare Kavitäten der Makromolekül(e), durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen, van-der-Waals-Brücken oder π - π -Wechselwirkung zwischen dem(n) Makromolekül(en) und dem(n) Elektron-Donor-Molekül(en) oder -Molekülteil(en)
45 und/oder dem(n) Elektron-Akzeptor-Molekül(en) oder -Molekülteil(en) erfolgt. In diesem Fall bilden also die Makromolekül(e) und die Elektron-Donor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) und die Elektron-Akzeptor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) die photoinduzierbar redoxaktive Einheit. Die photoinduzierbar redoxaktive Einheit kann also z. B. ein photoinduzierbar redoxaktives Protein oder Enzym, ein photoinduzierbar redoxaktiver, kovalent verknüpfter (wenigstens bimolekularer) Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplex oder ein photoinduzierbar redoxaktiver Charge-Transfer-Komplex
50 plex sein. Die angesprochenen Donor- und Akzeptor-Moleküle (oder -Molekülteile) bilden erfindungsgemäß eine redoxaktive Einheit, d. h. sie sind direkt oder über weitere Molekülteile aneinander gebunden. Einzige erfindungsgemäße Einschränkung der die Bestandteile der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit verbindenden Moleküle oder Molekülteile ist der Ausschluß von Nukleinsäure-Oligomeren. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist die photoinduzierbar redoxaktive Einheit als eine komplette Einheit an das Probe-Oligonukleotid gebunden, wobei natürlich mehrere chemische Bindungen
55 zwischen Oligonukleotid und der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit ausgebildet werden können. Durch den Ausschluß von Nukleinsäure-Oligomeren als die Bestandteile der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit verbindenden Moleküle oder Molekülteile soll verdeutlicht werden, daß nicht einzelne Teile der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an verschiedenen Stellen des Probe-Oligonukleotids angebunden sind. Das Probe-Oligonukleotid stellt also explizit nicht die Verbindung zwischen den Elektron-Donor-Molekül(en) oder -Molekülteil(en) und den Elektron-Akzeptor-Molekül(en) oder -Molekülteil(en) der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit dar.

"Photoinduzierbar" heißt im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß die Redoxaktivität der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit, also deren Eigenschaft unter bestimmten äußeren Umständen an einen geeigneten Elektron-Akzeptor Elektronen abzugeben oder von einem geeigneten, externen Elektron-Donor Elektronen aufzunehmen, erst durch Einstrahlen von Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge entfaltet wird. Durch Einstrahlung von Licht bestimmter oder
65 beliebiger Wellenlänge gibt der Elektron-Donor an einen der Elektron-Akzeptoren ein Elektron ab und es bildet sich, zumindest temporär, ein ladungsgetrennter Zustand D⁺A⁻ aus oxidiertem Donor und reduziertem Akzeptor. Dieser Vorgang innerhalb der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit wird als photoinduzierte Ladungstrennung bezeichnet. Bei entsprechend gewählten äußeren Umständen entfaltet die photoinduzierbar redoxaktive Einheit ihre Redoxaktivität erst im la-

dungsgetreunten Zustand, da die externen Donoren (bzw. Akzeptoren) nur auf den oxidierten Donor (bzw. vom reduzierten Akzeptor) der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit Elektronen übertragen (bzw. aufnehmen), z. B. in Gegenwart eines externen Oxidationsmittels, das A⁺, jedoch nicht A, oxidieren kann (bzw. in Gegenwart eines Reduktionsmittels, das D⁺, jedoch nicht D, reduziert kann). Entsprechend kann eine photoinduzierbar redoxaktive Einheit auch erst nach der photoinduzierten Ladungstrennung ein Elektron an eine Elektrode abgeben (bzw. von dieser aufnehmen), wenn die Elektrode auf ein Potential gesetzt wird, bei dem A⁺, jedoch nicht A, oxidiert (bzw. D⁺, jedoch nicht D, reduziert) wird.

Mit dem Begriff "freie redoxaktive Substanz" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine nicht an ein Nukleinsäure-Oligomer gebundene, aber mit dem Nukleinsäure-Oligomer in Kontakt stehende, redoxaktive Substanz bezeichnet, wobei diese Substanz z. B. ein ungeladenes Molekül, eine beliebige Salz oder ein redoxaktives Protein oder Enzym (Oxydoreductase) sein kann. Die freie redoxaktive Substanz ist dadurch gekennzeichnet, daß sie den oxidierten Donor (bzw. den reduzierten Akzeptor) der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit re-reduzieren (bzw. re-oxidieren) kann. Des weiteren ist die freie redoxaktive Substanz dadurch gekennzeichnet, daß sie bei einem Potential ϕ oxidierbar und reduzierbar ist, wobei ϕ der Bedingung $2,0 \text{ V} \geq \phi \geq -2,0 \text{ V}$ genügt. Das Potential bezieht sich hierbei auf das freie redoxaktive Molekül in einem geeigneten Lösungsmittel, gemessen gegen Normalwasserstoffelektrode. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist der Potentialbereich $1,7 \text{ V} \geq \phi \geq -1,7 \text{ V}$ bevorzugt, wobei der Bereich $1,4 \text{ V} \geq \phi \geq -1,2 \text{ V}$ besonders bevorzugt ist und der Bereich $0,9 \text{ V} \geq \phi \geq -0,7 \text{ V}$, in dem die redoxaktiven Substanzen der Anwendungsbeispiele oxidiert (bzw. reduziert) werden, ganz besonders bevorzugt ist.

Das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer ist direkt oder indirekt (über einen Spacer) an eine leitfähige Oberfläche gebunden. Unter dem Begriff "leitfähige Oberfläche" wird jede elektrisch leitfähige Oberfläche beliebiger Dicke verstanden, insbesondere metallische Oberflächen, Oberflächen aus Metallegierungen oder dotierte oder nicht dotierte Halbleitoberflächen, wobei sämtliche Halbleiter als Reinsubstanzen oder als Gemische Verwendung finden können. Die leitfähige Oberfläche kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung alleine oder auf einem beliebigen Trägermaterial, wie z. B. Glas, aufgebracht vorliegen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird der Begriff "Elektrode" alternativ zu "leitfähige Oberfläche" gebraucht.

Unter dem Begriff "modifizierte leitfähige Oberfläche" wird eine leitfähige Oberfläche verstanden, die durch Anbindung eines mit einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit modifizierten Nukleinsäure-Oligomers modifiziert ist.

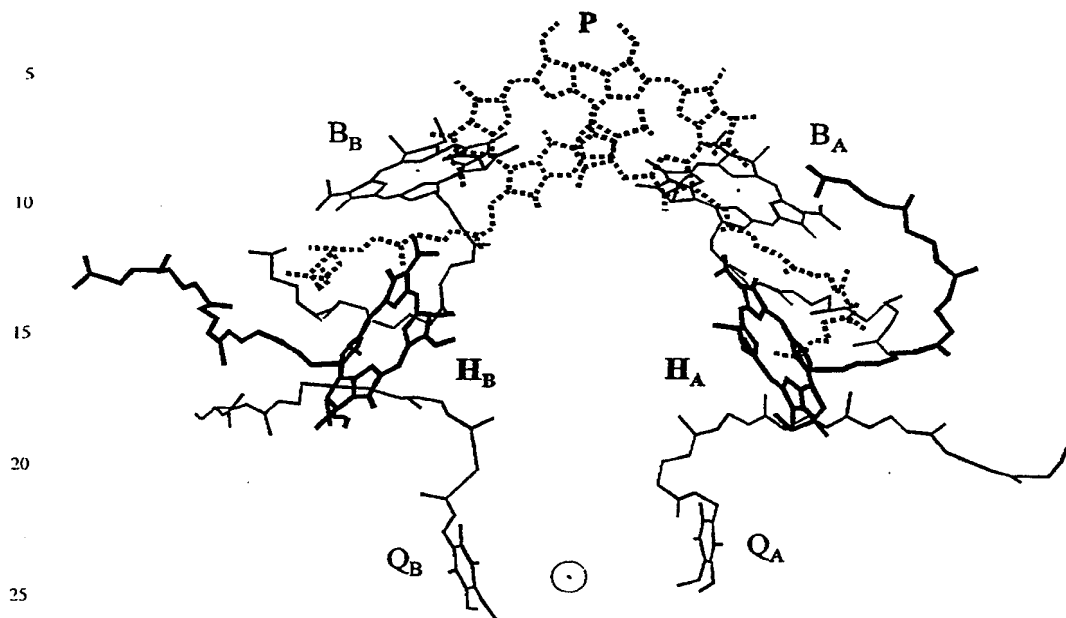
Gemäß eines weiteren Aspekts betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, das die elektrochemische Detektion molekularer Strukturen, insbesondere die elektrochemische Detektion von DNA-/RNA-/PNA-Fragmenten in einer Probenlösung durch sequenzspezifische Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierung ermöglicht. Die Detektion der Hybridisierungsereignisse durch elektrische Signale ist eine einfache und kostengünstige Methode und ermöglicht in einer batteriebetriebenen Variante den Einsatz vor Ort.

Außerdem stellt betrifft die vorliegende Erfindung ein photoadressierbares Ausleseverfahren zur Detektion molekularer Strukturen zur Verfügung, unter anderem zur Detektion von Hybridisierungsereignissen auf einem Oligomer-Chip durch z. B. elektrische Signale. Erfindungsgemäß wird unter photoadressierbarem (Oligomer-Chip-) Ausleseverfahren ein Verfahren verstanden, bei dem die Detektion molekularer Strukturen auf ein bestimmtes Test-Site oder eine bestimmte Test-Site-Gruppe innerhalb des Gesamtsystems (des kompletten Oligomer-Chips) begrenzt wird, indem Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge zur Induktion der Redoxaktivität der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit räumlich auf diese Test-Site (-Gruppe) fokussiert (begrenzt) wird.

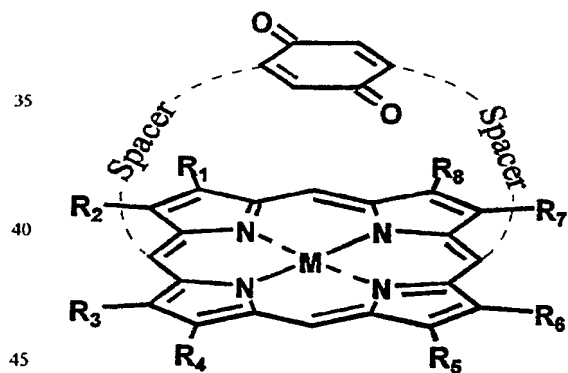
Bindung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer

Voraussetzung für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Bindung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer. Als Beispiele einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit seien genannt:

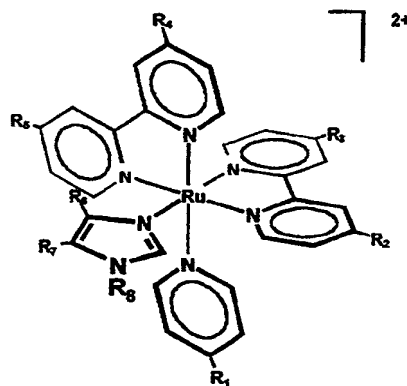
- (i) das photosynthetische bakterielle Reaktionszentrum (RC), wie z. B. das RC von *Rhodobacter sphaeroides* mit der schematischen Struktur 1, das RC anderer photosynthetischer Bakterien, wie z. B. das Reaktionszentrum von *Rhodopseudomonas viridis* oder von *Rhodobacter capsulatus*, oder ein Reaktionszentrum der Photosynthese betreibenden Pflanzen, wie z. B. das Photosystem 1 oder das Photosystem 2, als Beispiele für ein photoinduzierbar redoxaktives Protein/Enzym.
- (ii) Cyclophane, also verbrückte Porphyrin-Chinon-Systeme, der allgemeinen Struktur 2 als Beispiel für einen photoinduzierbar redoxaktiven, kovalent verknüpften, wenigstens bimolekularen Elektron-Donor/Elektron-Akzeptor-Komplex. Die beiden Spacer-verbrückten, kovalenten Verbindungen zwischen dem Elektron-Akzeptor (1,4-Benzochinon in der Struktur 2) und dem Elektron-Donor (Porphyrin in der Struktur 2) können an beliebigen Stellen des Elektron-Donors und/oder Elektron-Akzeptors angebracht sein. Neben den in der Struktur 2 gezeigten Elektron-Akzeptoren können auch Flavine der allgemeinen Formel 1, Nicotinsäureamide der allgemeinen Formel 2 oder andere Chinone, z. B. solche der allgemeinen Formeln 3-8 oder organische bzw. anorganische Elektron-Akzeptoren und außerdem neben den (Metallo-)Porphyrinen der allgemeinen Formel 9 andere Elektron-Donoren, wie z. B. (Metallo-)Chlorophylle der allgemeinen Formel 10 oder (Metallo-) Bakteriochlorophylle der allgemeinen Formel 11 oder andere organische bzw. anorganische Elektron-Donoren verwendet werden. Daneben können auch einfach kovalent (Spacer-)verbrückte Elektron-Donor/Elektron-Akzeptor-Komplexe wie z. B. kovalente Verbindungen einer Substanz gemäß Formel 9 und einer der Substanzen gemäß einer der Formeln 1-8, kovalente Verbindungen einer Substanz gemäß Formel 10 und einer der Substanzen gemäß einer der Formeln 1-8 oder kovalente Verbindungen einer Substanz gemäß Formel 11 und einer der Substanzen gemäß einer der Formeln 1-8 als photoinduzierbar redoxaktive, kovalent verknüpfte, wenigstens bimolekulare Elektron-Donor/Elektron-Akzeptor-Komplexe verwendet werden.
- (iii) Übergangsmetall-Komplexe wie z. B. $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{py})(\text{im})]^{2+}$ der allgemeinen Struktur 3, beliebige andere $[\text{Ru}(\text{II})(\text{L}1)(\text{L}2)(\text{L}3)(\text{L}4)(\text{L}5)(\text{L}6)]$ -Komplexe, $\text{Cr}(\text{III})$ -, $\text{Fe}(\text{II})$ -, $\text{Os}(\text{II})$ -, oder $\text{Co}(\text{II})$ -Komplexe als Beispiele für einen photoinduzierbar redoxaktiven Charge-Transfer-Komplex.



Struktur 1: Reaktionszentrum bestehend aus den Cofaktoren P (primärer Donor, ein Bakteriochlorophyll Dimer), B_A und B_B (Bakteriochlorophyll Monomere), H_A und H_B (Bakteriopheophytine), Q_A und Q_B (Ubichinon-50) und den Proteinuntereinheiten L, M, und H (nicht gezeigt), die die Cofaktoren einhüllen.

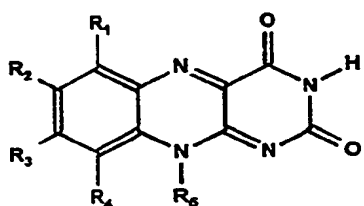


Struktur 2

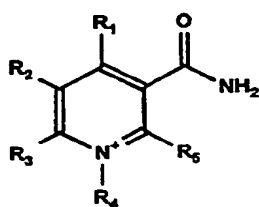


Struktur 3

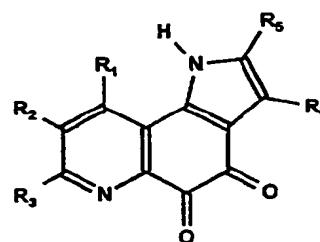
M = z. B. 2H, Mg, Zn, Cu, Ni, Pd, Co, Cd, Mn, Fe, Sn, Pt etc.; R₁ bis R₈, Spacer = z. B. beliebiger Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkynyl-Substituent.



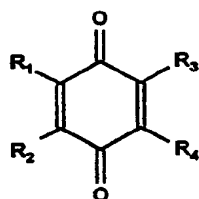
Formel 1



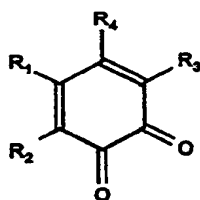
Formel 2



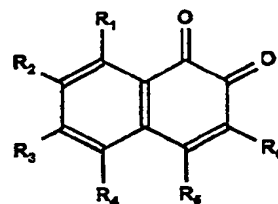
Formel 3



Formel 4

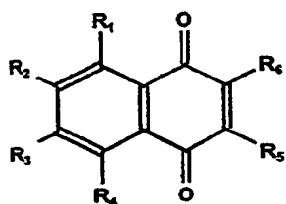


Formel 5

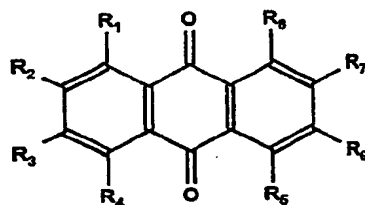


Formel 6

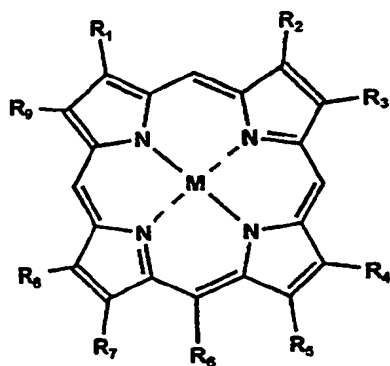
R₁ bis R₈ = beliebiger Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkinyl-Substituent.



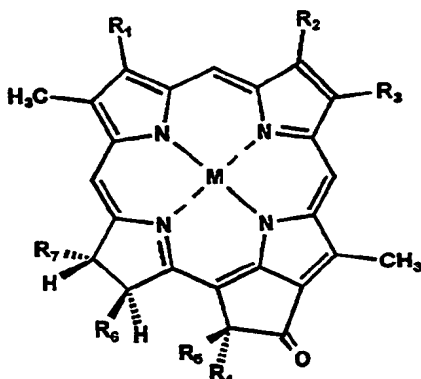
Formel 7



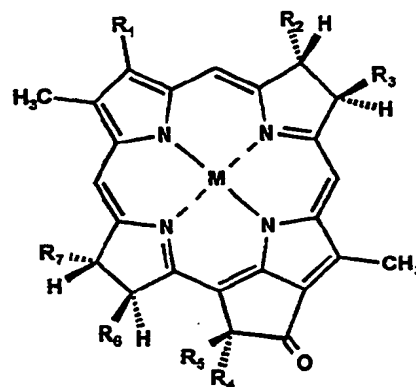
Formel 8



Formel 9



Formel 10



Formel 11

M = 2H, Mg, Zn, Cu, Ni, Pd, Co, Cd, Mn, Fe, Sn, Pt etc.; R₁ bis R₈ = beliebiger Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkinyl-Substituent.

Daneben zeichnet sich die photoinduzierbar redoxaktive Einheit erfindungsgemäß dadurch aus, daß besagte Einheit an einen anderen, ebenfalls kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebindenen Elektron-Akzeptor photoinduziert Elektronen abgibt bzw. von einem anderen ebenfalls kovalent an das Oligonukleotid angebindenen Elektron-Donor photoinduziert Elektronen aufnimmt, wobei dieser andere Elektron-Donor oder Elektron-Akzeptor insbesondere eine elektrisch leitfähige Oberfläche (Elektrode) ist und die photoinduzierbar redoxaktive Einheit durch Anlegen einer äußeren Spannung an dieser Elektrode im elektrochemisch zugänglichen Potentialbereich der Elektrode elektrooxidiert/-reduziert werden kann.

Die redoxaktive Substanz zeichnet sich erfindungsgemäß dadurch aus, daß sie die photoinduzierbar redoxaktive Einheit, nach deren Elektron-Abgabe an einen anderen, von der redoxaktiven Substanz verschiedenen, kovalent an das Oligonukleotid angebindenen Elektron-Akzeptor re-reduzieren kann (nach deren Elektron-Aufnahme von einem anderen, von der redoxaktiven Substanz verschiedenen, kovalent an das Oligonukleotid angebindenen Elektron-Donor reoxidierten kann). Die redoxaktive Substanz stellt also die photoinduzierbar redoxaktive Einheit in ihrem ursprünglichen, vor der photoinduzierten Abgabe bzw. Aufnahme eines Elektrons an den anderen, ebenfalls kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebindenen Elektron-Akzeptors bzw. Elektron-Donors vorhandenen Zustand, wieder her. Erfindungsgemäß kann dazu jede redoxaktive Substanz verwendet werden, solange sie bei einem Potential ϕ , das der Bedingung $2,0 \text{ V} \geq \phi \geq -2,0 \text{ V}$ genügt, oxidierbar und reduzierbar ist und das Potential geeignet ist, besagte photoinduzierbar redoxaktive Einheit nach deren Elektron-Abgabe an einen anderen, ebenfalls kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebindenen Elektron-Akzeptor zu re-reduzieren (bzw. nach deren Aufnahme eines Elektrons von einem anderen, ebenfalls kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebindenen Elektron-Donor zu re-oxidieren). Das Potential bezieht sich hierbei auf die freie, unmodifizierte, redoxaktive Substanz in einem geeigneten Lösungsmittel, gemessen gegen Normalwasserstoffelektrode. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist der Potentialbereich $1,7 \text{ V} \geq \phi \geq -1,7 \text{ V}$ bevorzugt, wobei der Bereich $1,4 \text{ V} \geq \phi \geq -1,2 \text{ V}$ besonders bevorzugt ist und der Bereich $0,9 \text{ V} \geq \phi \geq -0,7 \text{ V}$, in dem die redoxaktiven Substanzen der Anwendungsbeispiele oxidiert (und rereduziert) werden, ganz besonders bevorzugt ist. Geeignet sind, neben den üblichen organischen und anorganischen redoxaktiven Molekülen wie z. B. Hexacyanoferraten, Ferrocenen, Cobaltocenen und Chinonen vor allem die Ascorbinsäure (oder das Na⁺ Salz davon), [Ru(NH₃)₆]²⁺, oder Cytochrom c₂ (cyt c₂)²⁺, ein frei bewegliches eisenhaltiges Protein, das den oxidierten primären Donor P⁺ in RC von Rhodobacter sphaeroides zu P reduziert und dabei selbst zu (cyt c₂)³⁺ oxidiert wird.

Erfindungsgemäß wird eine photoinduzierbar redoxaktive Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer kovalent durch die Reaktion des Nukleinsäure-Oligomers mit der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit oder Teilen davon (siehe auch Abschnitt "Wege zur Ausführung der Erfindung") gebunden. Diese Bindung kann auf vier verschiedene Arten durchgeführt werden:

a) Als reaktive Gruppe zur Bindungsbildung am Nukleinsäure-Oligomer wird eine freie Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe des Oligonukleotid-Rückgrats, insbesondere eine Gruppe an einem der beiden Enden des Oligonukleotid-Rückgrats, verwendet. Die freien, endständigen Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppen weisen eine erhöhte Reaktivität auf und gehen daher leicht typische Reaktionen wie z. B. Amidbildung mit (primären oder sekundären) Aminogruppen bzw. mit Säuregruppen, Esterbildung mit (primären, sekundären oder tertiären) Alkoholen bzw. mit Säuregruppen, Thioesterbildung mit (primären, sekundären oder tertiären) Thio-Alkoholen bzw. mit Säuregruppen oder die Kondensation von Amin und Aldehyd mit anschließender Reduktion der entstandenen CH=N Bindung zur CH₂-NH Bindung ein. Die zur kovalenten Anbindung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit nötige Kopplungsgruppe (Säure-, Amin-, Alkohol-, Thioalkohol- oder Aldehydfunktion) ist entweder natürlicherweise an der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit vorhanden oder wird durch chemische Modifikation der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit erhalten. Die Anbindung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit kann komplett oder in Teilen der Einheit mit anschließender Vervollständigung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit erfolgen (siehe unten).

b) Das Nukleinsäure-Oligomer ist über einen kovalent angebindenen Molekülteil (Spacer) beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge (längste durchgehende Kette von aneinander gebundenen Atomen), insbesondere der Kettenlänge 1 bis 14, am Oligonukleotid-Rückgrat bzw. an einer Base mit einer reaktiven Gruppe modifiziert. Die Modifikation erfolgt bevorzugt an einem der Enden des Oligonukleotid-Rückgrats bzw. an einer terminalen Base. Als Spacer kann z. B. ein Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkinylsubstituent verwendet werden. Mögliche einfache Reaktionen zur Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen photoinduzierbar redoxaktiver Einheit und des so modifizierten Nukleinsäure-Oligomers sind wie unter a) beschrieben, die Amidbildung aus Säure- und Amino-Gruppe, die Esterbildung aus Säure- und Alkohol-Gruppe, die Thioesterbildung aus Säure- und Thio-Alkohol-Gruppe oder die Kondensation von Aldehyd und Amin mit anschließender Reduktion der entstandenen CH=N Bindung zur CH₂-NH Bindung. Die Anbindung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit kann komplett oder in Teilen der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit mit anschließender Vervollständigung der Einheit erfolgen (siehe unten).

c) Bei der Synthese des Nukleinsäure-Oligomers wird eine terminale Base durch die photoinduzierbar redoxaktive Einheit ersetzt. Diese Anbindung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit kann komplett oder in Teilen der Einheit mit anschließender Vervollständigung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit erfolgen (siehe unten).

d) Bei der Verwendung eines kovalent verknüpften (wenigstens bimolekularen) Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplexes als photoinduzierbar redoxaktiver Einheit wird der Elektron-Akzeptor (oder -Donor) in einer ersten kovalenten Modifikation, wie unter b) oder c) in diesem Abschnitt beschrieben, an eine oder statt einer terminalen Base an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden und anschließend in einer zweiten kovalenten Modifikation der Elektron-Donor (oder -Akzeptor), wie unter a) in diesem Abschnitt beschrieben, am selben Ende des Nukleinsäure-Oligomer-Rückgrats an eine reaktive Gruppe des Rückgrats gebunden. Bei Verwendung eines kovalent verknüpf-

ten, tri- oder höhermolekularen Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplexes kann, statt des Elektron-Akzeptors (oder -Donors), auch ein beliebiger Teil des Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplexes in der ersten kovalenten Modifikation verwendet und in der zweiten kovalenten Modifikation komplettiert werden.

Erfindungsgemäß kann die Bindung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an das Nukleinsäure-Oligomer ganz oder in Teilen vor oder nach der Bindung des Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche erfolgen. So kann im Falle eines photoinduzierbar redoxaktiven Proteins/Enzyms aus Apoprotein und Cofaktor(en) statt der kompletten photoinduzierbar redoxaktiven Einheit auch nur das Apoprotein oder ein Cofaktor angebunden sein und die photoinduzierbar redoxaktive Einheit wird durch anschließende Rekstitution mit den noch fehlenden Teilen komplettiert. Bei der Verwendung eines kovalent verknüpften (wenigstens bimolekularen) Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplexes als photoinduzierbar redoxaktiver Einheit wird der Elektron-Akzeptor (oder -Donor) in einer ersten kovalenten Modifikation, wie unter b) oder c) in diesem Abschnitt beschrieben, an oder statt einer terminalen Base an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden und anschließend in einer zweiten kovalenten Modifikation der Elektron-Donor (oder -Akzeptor), wie unter a) in diesem Abschnitt beschrieben, am selben Ende des Nukleinsäure-Oligomer-Rückgrats an eine reaktive Gruppe des Rückgrats gebunden. Bei Verwendung eines kovalent verknüpften, tri- oder höhermolekularen Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplexes kann, statt des Elektron-Akzeptors (oder -Donors), auch ein beliebiger Teil des Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplexes in der ersten kovalenten Modifikation verwendet und in der zweiten kovalenten Modifikation komplettiert werden. Diese Modifikationen können vor oder nach der Bindung des Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche erfolgen.

Bei mehreren verschiedenen Nukleinsäure-Oligomer-Kombinationen (Test-Sites) auf einer gemeinsamen Oberfläche ist es vorteilhaft, die (kovalente) Anbindung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an die Nukleinsäure-Oligomere durch geeignete Wahl der reaktiven Gruppe an den freien Nukleinsäure-Oligomerenenden der verschiedenen Test-Sites für die gesamte Oberfläche zu vereinheitlichen, wenn die photoinduzierbar redoxaktive Einheit nach Immobilisierung des Nukleinsäure-Oligomers an der Oberfläche angebunden werden soll.

Bei Verwendung von photoinduzierbar redoxaktiven Proteinen/Enzymen als photoinduzierbar redoxaktiver Einheit kann die kovalente Anbindung des Nukleinsäure-Oligomers an eine beliebige, natürlicherweise vorhandene oder durch Modifikation angebrachte, reaktive Gruppe des Proteins erfolgen oder – in dem Falle, daß das photoinduzierbar redoxaktive Protein/Enzym aus Apoprotein und Cofaktor(en) besteht – an eine beliebige, natürlicherweise vorhandene oder durch Modifikation angebrachte, reaktive Gruppe eines (beliebigen) Cofaktors. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die kovalente Anbindung an eine beliebige, natürlicherweise vorhandene oder durch Modifikation angebrachte, reaktive Gruppe eines (beliebigen) Cofaktors des Proteins bevorzugt. Ohne an mechanistische Details gebunden sein zu wollen, ist bei mehreren Cofaktoren derjenige besonders bevorzugt, der Elektronen an einen anderen, externen, ebenfalls kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebundenen Elektron-Akzeptor abgeben oder von einem anderen, externen, ebenfalls kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebundenen Elektron-Donor aufnehmen kann (siehe auch Abschnitt "Verfahren zur amperometrischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden").

Die leitfähige Oberfläche

Unter dem Begriff "leitfähige Oberfläche" wird erfindungsgemäß jeder Träger mit einer elektrisch leitfähigen Oberfläche beliebiger Dicke verstanden, insbesondere Oberflächen aus Platin, Palladium, Gold, Cadmium, Quecksilber, Nickel, Zink, Kohlenstoff, Silber, Kupfer, Eisen, Blei, Aluminium und Mangan.

Daneben können auch beliebige dotierte oder nicht dotierte Halbleiteroberflächen beliebiger Dicke verwendet werden. Sämtliche Halbleiter können als Reinsubstanzen oder als Gemische Verwendung finden. Als nicht einschränkend gemeinte Beispiele seien an dieser Stelle Kohlenstoff, Silizium, Germanium, α -Zinn, Cu(I)- und Ag(I)-Halogenide beliebiger Kristallstruktur genannt. Geeignet sind ebenfalls sämtliche binären Verbindungen beliebiger Zusammensetzung und beliebiger Struktur aus den Elementen der Gruppen 14 und 16, den Elementen der Gruppen 13 und 15, sowie den Elementen der Gruppen 15 und 16. Daneben können ternäre Verbindungen beliebiger Zusammensetzung und beliebiger Struktur aus den Elementen der Gruppen 11, 13 und 16 oder den Elementen der Gruppen 12, 13 und 16 verwendet werden. Die Bezeichnungen der Gruppen des Periodensystems der Elemente beziehen sich auf die IUPAC-Empfehlung von 1985.

Bindung eines Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche

Erfindungsgemäß wird ein Nukleinsäure-Oligomer direkt oder über einen Linker/Spacer mit den Oberflächenatomen oder -molekülen einer leitfähigen Oberfläche der oben beschriebenen Art verknüpft. Diese Bindung kann auf drei verschiedene Arten durchgeführt werden:

- a) Die Oberfläche wird so modifiziert, daß eine reaktive Molekül-Gruppe zugänglich ist. Dies kann durch direkte Derivatisierung der Oberflächenmoleküle, z. B. durch naßchemische oder elektrochemische Oxidation/Reduktion geschehen. So kann z. B. die Oberfläche von Graphitelektroden durch Oxidation naßchemisch mit Aldehyd- oder Carbonsäure-Gruppen versehen werden. Elektrochemisch besteht z. B. die Möglichkeit durch Reduktion in Gegenwart von Aryl-Diazoniumsalzen das entsprechende (funktionalisierte, also mit einer reaktiven Gruppe versehene) Aryl-Radikal oder durch Oxidation in Gegenwart von $R'CO_2H$ das (funktionalisierte) R' -Radikal auf der Graphitelektrodenoberfläche anzukoppeln. Ein Beispiel der direkten Modifikation von Halbleiteroberflächen ist die Derivatisierung von Siliziumoberflächen zu reaktiven Silanolen, d. h. Silizium-Träger mit Si-OR-Gruppen an der Oberfläche, wobei R'' ebenso wie R' einen beliebigen, funktionalisierten, organischen Rest darstellt (z. B. Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkynylsubstituent). Alternativ kann die gesamte Oberfläche durch die kovalente Anbindung einer reaktiven Gruppe eines bifunktionalen Linkers modifiziert werden, so daß

auf der Oberfläche eine monomolekulare Schicht beliebiger Moleküle entsteht, die, bevorzugt endständig, eine reaktive Gruppe enthalten. Unter dem Begriff "bifunktionaler Linker" wird jedes Molekül beliebiger Kettenlänge, insbesondere der Kettenlängen 2–14, mit zwei gleichen (homo-bifunktional) oder zwei verschiedenen (hetero-bifunktional) reaktiven Molekül-Gruppen verstanden.

Sollen mehrere verschiedene Test-Sites auf der Oberfläche durch Ausnutzen der Methodik der Photolithographie gebildet werden, so ist mindestens eine der reaktiven Gruppen des homo- oder hetero-bifunktionalen Linkers eine photoinduzierbar reaktive Gruppe, d. h. eine erst durch Lichteinstrahlung bestimmter oder beliebiger Wellenlänge reaktiv werdende Gruppe. Dieser Linker wird so aufgebracht, daß die/eine photoaktivierbare reaktive Gruppe nach der kovalenten Anbindung des Linkers auf der Oberfläche zur Verfügung steht. An die so modifizierte Oberfläche werden die Nukleinsäure-Oligomere kovalent angebunden, wobei diese selbst über einen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 0–14, mit einer reaktiven Gruppe modifiziert sind, bevorzugt in der Nähe eines Endes des Nukleinsäure-Oligomers. Bei der reaktiven Gruppe des Oligonukleotids handelt es sich um Gruppen, die direkt (oder indirekt) mit der modifizierten Oberfläche unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren. Daneben kann an die Nukleinsäure-Oligomere in der Nähe ihres anderen Endes eine weitere reaktive Gruppe gebunden sein, wobei diese reaktive Gruppe wiederum, wie oben beschrieben, direkt oder über einen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 0–14, angebunden ist. Desweiteren kann die photoinduzierbar redoxaktive Einheit (komplett oder Bestandteile davon), alternativ zu dieser weiteren reaktiven Gruppe, an diesem anderen Ende des Nukleinsäure-Oligomers angebunden sein.

b) Das Nukleinsäure-Oligomer, das auf die leitfähige Oberfläche aufgebracht werden soll, ist über einen kovalent angebundenen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 0–14, mit einer reaktiven Gruppe modifiziert, wobei sich die reaktive Gruppe bevorzugt in der Nähe eines Endes des Nukleinsäure-Oligomers befindet. Bei den reaktiven Gruppen handelt es sich um Gruppen, die direkt mit der unmodifizierten Oberfläche reagieren können. Beispiele hierfür sind: (i) Thiol- (HS-) oder Disulfid- (S-S-) derivatisierte Nukleinsäure-Oligomere der allgemeinen Formel HS-Spacer-oligo bzw. R-S-S-Spacer-oligo oder oligo-Spacer-S-S-Spacer-oligo, die mit einer Goldoberfläche unter Ausbildung einer Gold-Schwefelbindung reagieren oder (ii) Amine, die sich durch Chemi- oder Physisorption an Platin- oder Silizium-Oberflächen anlagern. Daneben kann an die Nukleinsäure-Oligomere in der Nähe ihres anderen Endes eine weitere reaktive Gruppe gebunden sein, wobei diese reaktive Gruppe wiederum, wie oben beschrieben, direkt oder über einen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 0–14, angebunden ist. Des weiteren kann die photoinduzierbar redoxaktive Einheit (komplett oder Bestandteile davon), alternativ zu dieser weiteren reaktiven Gruppe, an diesem anderen Ende des Oligonukleotids angebunden sein.

c) Als reaktive Gruppe am Probe-Nukleinsäure-Oligomer werden die Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppen des Oligonukleotid-Phosphatgerüsts, insbesondere endständige Gruppen, verwendet.

Die Phosphorsäure-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppen weisen eine erhöhte Reaktivität auf und gehen daher leicht typische Reaktionen wie z. B. Amidbildung mit (primären oder sekundären) Amino- bzw. Säuregruppen, Esterbildung mit (primären, sekundären oder tertiären) Alkoholen bzw. Säuregruppen, Thioesterbildung mit (primären, sekundären oder tertiären) Thio-Alkoholen bzw. Säuregruppen oder die Kondensation von Amin und Aldehyd mit anschließender Reduktion der entstandenen CH=N Bindung zur $\text{CH}_2\text{-NH}$ Bindung ein. Die nötige Kopplungs-Gruppe zur kovalenten Anbindung an die Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe ist in diesem Fall ein Teil der Oberflächenderivatisierung mit einer (monomolekularen) Schicht beliebiger Moleküllänge, wie unter a) in diesem Abschnitt beschrieben, oder die Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe kann direkt mit der unmodifizierten Oberfläche reagieren, wie unter b) in diesem Abschnitt beschrieben. Daneben kann an die Oligonukleotide in der Nähe ihres anderen Endes eine weitere reaktive Gruppe gebunden sein, wobei diese reaktive Gruppe wiederum, wie oben beschrieben, direkt oder über einen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 0–14, angebunden ist. Desweiteren kann die photoinduzierbar redoxaktive Einheit (komplett oder Bestandteile davon), alternativ zu dieser weiteren reaktiven Gruppe, an diesem anderen Ende des Nukleinsäure-Oligomers angebunden sein.

Die Bindung des Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche kann vor oder nach der Anbindung der photoinduzierbar redoxaktive Einheit an das Nukleinsäure-Oligomer erfolgen. Im Falle eines photoinduzierbar redoxaktiven Proteins/Enzyms aus Apoprotein und Cofaktor(en) kann statt der kompletten photoinduzierbar redoxaktiven Einheit auch nur das Apoprotein oder Cofaktor angebunden sein und die photoinduzierbar redoxaktive Einheit wird durch anschließende Rekonstitution mit den noch fehlenden Teilen komplettiert. Bei der Verwendung eines kovalent verknüpften (wenigstens bimolekularen) Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplexes als photoinduzierbar redoxaktive Einheit kann der Elektron-Akzeptor (bzw. -Donor), wie unter b) oder c) im Abschnitt "Bindung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer" beschrieben, an eine oder statt einer terminalen Base an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden sein und der Elektron-Donor (bzw. -Akzeptor) durch anschließende kovalente Anbindung oder, wie unter a) im Abschnitt "Bindung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer" beschrieben, durch anschließende Anbindung an eine terminale reaktive Gruppe des Nukleinsäure-Oligomer-Rückgrats am selben Ende gebunden werden (siehe auch den Abschnitt "Wege zur Ausführung der Erfindung"). Alternativ kann die Bindung des Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche vor oder nach Anbinden des mit einer reaktiven Gruppe versehenen Spacers zur Bindung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit erfolgen. Die Bindung des bereits modifizierten Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche, d. h. die Bindung an die Oberfläche nach der Anbindung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an das Nukleinsäure-Oligomer bzw. nach der Anbindung von Teilen der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit oder nach Anbinden des mit einer reaktiven Gruppe versehenen Spacers zur Bindung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit, erfolgt ebenfalls wie unter a) bis c) in diesem Abschnitt beschrieben.

Bei der Herstellung der Test-Sites muß bei der Anbindung der Einzelstrang-Nukleinsäure-Oligomere an die Oberflä-

che darauf geachtet werden, daß zwischen den einzelnen Nukleinsäure-Oligomeren ein genügend großer Abstand verbleibt, um zum einen den für eine Hybridisierung mit dem Target-Nukleinsäure-Oligomer nötigen Freiraum und zum anderen den für die Anbindung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit nötigen Freiraum zur Verfügung zu stellen. Dazu bieten sich insbesondere drei verschiedene Vorgehensweisen (und Kombinationen daraus) an:

1. Herstellung einer modifizierten Oberfläche durch Anbindung eines hybridisierten Nukleinsäure-Oligomers, also eine Oberflächen-Derivatisierung mit hybridisiertem Probe-Nukleinsäure-Oligomer statt mit Einzelstrang-Probe-Oligonukleotid. Der zur Hybridisierung verwendete Nukleinsäure-Oligomer-Strang ist unmodifiziert (die Oberflächenanbindung wird durchgeführt wie unter a)-c) in diesem Abschnitt beschrieben). Anschließend wird der hybridisierte Nukleinsäure-Oligomer-Doppelstrang thermisch dehybridisiert, wodurch eine mit Einzelstrang-Nukleinsäure-Oligomer modifizierte Oberfläche mit größerem Abstand zwischen den Probe-Nukleinsäure-Oligomeren hergestellt wird.
2. Herstellung einer modifizierten Oberfläche durch Anbindung eines Einzelstrang- oder Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomers, wobei während der Oberflächen-Derivatisierung mit Einzelstrang-Probe-Nukleinsäure-Oligomer ein geeigneter monofunktionaler Linker zugesetzt wird, der neben dem Einzelstrang- oder Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomer ebenfalls an die Oberfläche gebunden wird (die Oberflächenanbindung wird durchgeführt wie unter a)-c) in diesem Abschnitt beschrieben). Erfindungsgemäß hat der monofunktionale Linker eine Kettenlänge, die der Kettenlänge des Spacers zwischen der Oberfläche und dem Nukleinsäure-Oligomer identisch ist oder um maximal vier Kettenatome abweicht. Bei der Verwendung von Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomer gemeinsam mit geeignetem monofunktionalem Linker zur Oberflächen-Derivatisierung wird der Nukleinsäure-Oligomer-Doppelstrang nach der gemeinsamen Anbindung des Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomers und des Linkers an die Oberfläche thermisch dehybridisiert.
3. Herstellung einer modifizierten Oberfläche durch Anbindung eines Einzelstrang- oder Doppelstrang-Oligonukleotids, an das die photoinduzierbar redoxaktive Einheit bereits angebunden ist, wobei die photoinduzierbar redoxaktive Einheit einen Durchmesser von größer als 30 Å aufweist. Bei der Verwendung von Doppelstrang-Oligonukleotid wird der Oligonukleotid-Doppelstrang nach der Anbindung des Doppelstrang-Oligonukleotids an die Oberfläche thermisch dehybridisiert.

Im Bezug auf die einzelnen Schritte zur "Bindung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer" als auch zur "Bindung eines Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche" sei darauf verwiesen, daß im Abschnitt "Wege zur Ausführung der Erfindung" die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Schritte, die zum selben Endergebnis führen, an einem Beispiel demonstriert sind (Fig. 2).

Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden

Vorteilhafterweise werden gemäß dem Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden mehrere Probe-Nukleinsäure-Oligomere unterschiedlicher Sequenz, idealerweise alle möglichen Kombinationen des Nukleinsäure-Oligomers, auf einem Oligomer (DNA)-Chip aufgebracht, um die Sequenz eines beliebigen Target-Nukleinsäure-Oligomers oder einer (fragmentierten) Target-DNA zu detektieren bzw. um Mutationen im Target aufzuspüren und sequenzspezifisch nachzuweisen. Dazu werden auf einer leitfähigen Oberfläche die Oberflächenatome oder -moleküle eines definierten Bereichs (einer Test-Site) mit DNA-/RNA-/PNA-Nukleinsäure-Oligomeren bekannter, aber beliebiger Sequenz, wie oben beschrieben, verknüpft. Als Probe-Nukleinsäure-Oligomere werden Nukleinsäure-Oligomere (z. B. DNA-, RNA- oder PNA-Fragmente) der Basenlänge 3 bis 30, bevorzugt der Länge 5 bis 25, besonders bevorzugt der Länge 6 bis 18 verwendet. Erfindungsgemäß wird oder ist an die Probe-Nukleinsäure-Oligomere, wie nachfolgend beschrieben, eine photoinduzierbar redoxaktive Einheit gebunden.

Die Modifikation der Probe-Nukleinsäure-Oligomere mit einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit kann komplett oder in Bestandteilen der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit entweder vor oder nach der Bindung des Probe-Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche erfolgen. Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Schritte (Reaktionssequenzen), sind mit Hilfe der Fig. 2 am Beispiel einer über ein Probe-Oligonukleotid an eine Elektrode gebundenen photoinduzierbar redoxaktiven Einheit im Abschnitt "Wege zur Ausführung der Erfindung" demonstriert.

Unabhängig von der jeweiligen Reaktionssequenz entsteht ein Oberflächen-Hybrid der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Einheit, wobei "Einheit" repräsentativ für die photoinduzierbar redoxaktive Einheit steht. Im Beispiel der Fig. 2 ist die photoinduzierbar redoxaktive Einheit das Reaktionszentrum (RC) der Photosynthese betreibenden Bakterien des Stammes *Rhodospirillum rubrum*, ein photoinduzierbar redoxaktives Protein bestehend aus Apoprotein und Cofaktoren. Im Beispiel der Fig. 2, 3 und 4 ist das RC über seinen Cofaktor Ubichinon-50 (UQ) in der sogenannten Q_A -Protein-Bindungstasche des RCs kovalent mit dem Nukleinsäure-Oligomer verbunden. Das RC bildet mit dem Cofaktor Ubichinon-50 in der Q_A -Bindungstasche einen 1 : 1 Komplex, wobei das Ubichinon-50 in der beschriebenen Weise kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden ist. Im Beispiel der Fig. 5 und 6 ist die photoinduzierbar redoxaktive Einheit ein photoinduzierbar redoxaktiver Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplex, nämlich ein kovalent verknüpfter Zn-Bakteriochlorophyll-Chinon-Komplex, der über das Chinon, dem Elektron-Akzeptor-Molekül des Komplexes, kovalent über einen Spacer mit dem Nukleinsäure-Oligomer verbunden ist. Die elektrochemische Kommunikation zwischen der (leitfähigen) Oberfläche und der über ein Einzelstrang-Oligonukleotid verbrückten photoinduzierbar redoxaktiven Einheit ("Einheit") in der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Einheit ist schwach oder gar nicht vorhanden.

In einem nächsten Schritt werden die Test-Sites mit der zu untersuchenden Nukleinsäure-Oligomer-Lösung (Target) in Kontakt gebracht. Dabei kommt es nur in dem Fall zur Hybridisierung, wenn die Lösung Nukleinsäure-Oligomere, Stränge enthält, die zu den an die leitfähige Oberfläche gebundenen Probe-Nukleinsäure-Oligomeren komplementär, oder zumindest in weiten Bereichen komplementär sind. Im Falle der Hybridisierung zwischen Probe und Target kommt

es zu einer verstärkten Leitfähigkeit zwischen der Oberfläche und der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit, da diese nunmehr über das aus einem Doppelstrang bestehende Nukleinsäure-Oligomer verbrückt ist. Fig. 3 zeigt dies schematisch am Beispiel der Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-UQ(RC). In Fig. 4 ist die Sequenz der Elektron-Transfer-Schritte in Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-UQ(RC) im Detail gezeigt, während Fig. 5 das Beispiel Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Q-ZnBChl schematisch zeigt und Fig. 6 die Sequenz der Elektron-Transfer-Schritte in Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-Q-ZnBChl im Detail darstellt.

Aufgrund der Hybridisierung von Probe-Nukleinsäure-Oligomer und dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang (Target) verändert sich die elektrische Kommunikation zwischen der (leitfähigen) Oberfläche und der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit. Somit kann ein sequenzspezifisches Hybridisierungsereignis durch elektrochemische Verfahren wie z. B. Cyclovoltametrie, Amperometrie oder Leitfähigkeitsmessungen detektiert werden.

Bei der Cyclovoltametrie wird das Potential einer stationären Arbeitselektrode zeitabhängig linear verändert. Ausgehend von einem Potential bei dem keine Elektrooxidation oder -reduktion stattfindet, wird das Potential solange verändert bis die redoxaktive Substanz oxidiert oder reduziert wird (also Strom fließt). Nach Durchlaufen des Oxidations- bzw. Reduktionsvorgangs, der in der Strom/Spannungskurve einen zunächst ansteigenden Strom, dann einen Maximalstrom (Peak) und schließlich einen allmählich abfallenden Strom erzeugt, wird die Richtung des Potentialvorschubs umgekehrt. Im Rücklauf wird dann das Verhalten der Produkte der Elektrooxidation oder -reduktion aufgezeichnet.

Eine alternative elektrische Detektionsmethode, die Amperometrie, wird dadurch ermöglicht, daß die photoinduzierbar redoxaktive Einheit durch Anlegen eines geeigneten, konstant gehaltenen Elektrodenpotentials zwar elektrooxidiert (elektroreduziert) wird, die Rereduktion (Reoxidation) der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit in den ursprünglichen Zustand aber nicht wie in der Cyclovoltametrie durch Änderung des Elektrodenpotentials erfolgt, sondern durch ein der Targetlösung zugesetztes geeignetes Reduktionsmittel (Oxidationsmittel), der "redoxaktiven Substanz", wodurch der Stromkreis des Gesamtsystems geschlossen wird. Solange solches Reduktionsmittel (Oxidationsmittel) vorhanden ist bzw. solange das verbrauchte Reduktionsmittel (Oxidationsmittel) an der Gegenelektrode rereduziert (reoxidiert) wird, fließt Strom, der amperometrisch detektiert werden kann und der proportional zur Zahl der Hybridisierungsereignisse ist.

Dieses Prinzip der amperometrischen Detektion soll am Beispiel der Glucoseoxidase näher erläutert werden. Die Glucoseoxidase ist ein aus Apoprotein und einem Flavin-Adenin-Dinukleotid-Cofaktor bestehendes redoxaktives Enzym. Das mit einem Ende kovalent an die Elektrode angebundene Probe-Oligonukleotid kann am anderen, noch freien Ende mit der vollständigen enzymatischen Einheit der Glucoseoxidase funktionalisiert werden, indem z. B. der Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-Cofaktor des Enzyms kovalent an das Probe-Oligonukleotid angebunden wird und anschließend mit dem Glucoseoxidase-Apoprotein (GOx) rekonstituiert wird. Das entstandene Oberflächen-Hybrid der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-FAD(GOx) weist zwischen Elektrode und FAD keine oder nur geringe Leitfähigkeit auf. Im Falle der Hybridisierung mit dem zu "ss-oligo" komplementären Target-Oligonukleotid wird die Leitfähigkeit deutlich erhöht. Bei Zusatz des Substrats Glucose zur Target-Oligonukleotid-Lösung wird das FAD der Glucoseoxidase (FAD(GOx)) zu FADH_2 der Glucoseoxidase ($\text{FADH}_2(\text{GOx})$) reduziert, wobei Glucose zur Gluconsäure oxidiert wird. Liegt nun an der Elektrode ein geeignetes äußeres Potential an, so daß über das hybridisierte Oligonukleotid Elektronen von $\text{FADH}_2(\text{GOx})$ an die Elektrode abgegeben werden und somit $\text{FADH}_2(\text{GOx})$ zu $\text{FAD}(\text{GOx})$ reoxidiert wird (aber weder Glucose noch Gluconsäure bei diesem Potential elektrooxidiert oder -reduziert werden kann), fließt im System Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-FAD(GOx) solange Strom wie $\text{FAD}(\text{GOx})$ durch freie Glucose reduziert wird, d. h. bis die gesamte Glucose verbraucht ist bzw. für den Fall, daß an der Gegenelektrode ein Potential anliegt, bei dem Gluconsäure zu Glucose reduziert werden kann, solange wie Gluconsäure an der Gegenelektrode reduziert wird. Dieser Strom kann amperometrisch detektiert werden und ist proportional zur Zahl der Hybridisierungsereignisse.

Handelt es sich bei der redoxaktiven Einheit um eine photoinduzierbar redoxaktive Einheit, so wird die Redoxaktivität der Einheit erst durch Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge ausgelöst. Erfindungsgemäß wird diese Eigenschaft dadurch ausgenutzt, daß die elektrochemische Detektion erst durch Einstrahlen von Licht auf das Oberflächenhybrid der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-Einheit (Oberflächenhybrid mit hybridisiertem Target) ausgelöst wird und maximal solange aufrechterhalten wird wie die Lichteinstrahlung andauert. Insbesondere bei der amperometrischen Detektion fließt somit bei Verwendung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit, unter bestimmten äußeren Umständen, erst dann (längeranhaltend) Strom, wenn Licht auf das Oberflächenhybrid eingestrahlt wird. Solche äußere Umstände sind z. B. die Gegenwart eines geeigneten Reduktionsmittels (bzw. Oxidationsmittels), um einen durch Photoinduktion gebildeten, oxidierten Donor D^+ (bzw. reduzierten Akzeptor A^-) der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit zu reduzieren (bzw. zu reduzieren) und das Anlegen eines Potentials an der Elektrode, bei dem zwar ein durch Photoinduktion gebildeter reduzierter Akzeptor A^- (bzw. oxidiertes Donor D^+) der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit, nicht jedoch der nicht reduzierte Akzeptor A (bzw. der nicht oxidierte Donor D) oxidiert (bzw. reduziert) werden kann. Im Abschnitt "Wege zur Ausführung der Erfindung" wird dies anhand verschiedener Beispiele von Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Einheit mit photoinduzierbar redoxaktiver Einheit näher erläutert. Somit kann die Detektion bei Verwendung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit auf eine bestimmtes Test-Site oder eine bestimmte Test-Site-Gruppe des Oligomer-Chips räumlich beschränkt werden, indem das Licht auf dieses Test-Site oder auf diese Test-Site-Gruppe begrenzt wird. Erfindungsgemäß können also verschiedene Test-Sites (Nukleinsäure-Oligomer-Kombinationen) eines Oligomer-Chips auf eine gemeinsame, durchgängige, elektrisch leitende Oberfläche aufgebracht werden. Ein bestimmtes Test-Site oder eine bestimmte Test-Site-Gruppe kann einfach durch Anlegen eines geeigneten äußeren Potentials an die (gesamte) Oberfläche bei Lichteinstrahlung auf genau dieses Test-Site oder diese Test-Site Gruppe adressiert und amperometrisch detektiert werden. Die verschiedenen Test-Sites müssen also nicht auf einzelnen, elektrisch voneinander isolierten und zum Anlegen eines Potentials und Auslesen des Stroms einzeln ansteuerbaren (Mikro-)Elektroden aufgebracht werden. Darüberhinaus kann bei der Verwendung von Oberflächenhybriden der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Einheit mit photoinduzierbar redoxaktiver Einheit und amperometrischer Detektion der Ausleseprozeß zur Detektion der einzelnen sequenzspezifischen Hybridisierungsereignisse auf dem Oligomer-Chip dadurch optimiert werden, daß dies Test-Sites durch entsprechende Fokussierung des Lichts erst grobgerastert ausgelesen werden und dann in den Raster mit Hybridisierungsereignissen des Auflösungsvermögen sukzessive erhöht wird, also z. B. bei einem Oktamer-

Chip mit 65.536 Test-Sites zuerst in z. B. 64 Gruppen von je 1024 Test-Sites ausgelesen wird, dann die Test-Site-Gruppen, die anhand der amperometrischen Messungen Hybridisierungsereignisse aufweisen, z. B. in 32 Gruppen von je 32 Test-Sites durchgetestet werden und anschließend in den erneut Hybridisierungsereignisse aufweisenden Test-Site-Gruppen die Test-Sites einzeln ausgetestet werden. Die einzelnen Hybridisierungsereignisse können dadurch mit geringem experimentellen Aufwand schnell bestimmten Probe-Oligomeren zugeordnet werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen im Zusammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert werden. Es zeigen

Fig. 1 Schematische Darstellung der Oligonukleotid-Sequenzierung durch Hybridisierung auf einem Chip;

Fig. 2 Verschiedene Reaktionssequenzen zur Herstellung des Oberflächenhybrids Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-UQ(RC). Die photoinduzierbar redoxaktive Einheit in diesem Oberflächenhybrid ist das Reaktionszentrum (RC) der Photosynthese betreibenden Bakterien *Rhodobacter sphaeroides*. Dieses photoinduzierbar redoxaktive Protein besteht aus Apoprotein und Cofaktoren. Das RC ist über seinen Cofaktor Ubichinon-50 (UQ) in der sogenannten Q_A -Protein-Bindungstasche kovalent über einen Spacer mit dem Oligonukleotid verbunden;

Fig. 3 Schematische Darstellung der photoinduzierten amperometrischen Meßmethode am Beispiel des Oberflächenhybrids Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-UQ(RC) aus **Fig. 2** (hv: Einstrahlung von Licht, P: primärer Donor des RC, UQ: Ubichinon-50 Elektron Akzeptor in der Q_A -Protein-Bindungstasche des RC, Red/Ox: reduzierte bzw. oxidierte Form der freien, der Targetlösung zugesetzten redoxaktiven Substanz, z. B. $\text{cyt } c_2^{2+}$, Natriumascorbat oder $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2+}$, die die oxidierte Form P^+ in den ursprünglich neutralen Zustand P rereduzieren können, E_{ox} : Potential der Elektrode, bei dem UQ durch Elektronabgabe an die Elektrode zu UQ oxidiert wird, "hv an": Beginn der Lichteinstrahlung, "hv aus": Ende der Lichteinstrahlung);

Fig. 4 Detaillierte schematische Darstellung des Oberflächenhybrids $\text{Au-S}(\text{CH}_2)_2\text{-ds-oligo-Spacer-UQ(RC)}$ der **Fig. 3** mit Gold als Oberflächenmaterial, Mercaptoethanol als Spacer zwischen Elektrode und Oligonukleotid und die Darstellung der Sequenz der photoinduzierten Elektron-Transfer-Schritte. Das Apoprotein des RCs ist nur als Hülle (durchgezogene Linie) angedeutet (vgl. Struktur 1). Das 12 Bp Probe-Oligonukleotid der exemplarischen Sequenz 5'-TAGTCGGAAGCA-3' ist, als Ausschnitt, im hybridisierten Zustand gezeigt;

Fig. 5 Schematische Darstellung der photoinduzierten amperometrischen Meßmethode am Beispiel des Oberflächenhybrids Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Q-ZnBChl (hv: Einstrahlung von Licht, ZnBChl: das Elektron-Donor-Molekül *Zn-Bakteriochlorophyll*, Q: das Elektron-Akzeptor-Molekül Chinon, z. B. modifiziertes Anthrachinon oder PQQ, Red/Ox: reduzierte bzw. oxidierte Form der freien, der Targetlösung zugesetzten redoxaktiven Substanz, z. B. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2+}$, das die oxidierte Form des Elektron-Donors ZnBChl* in den ursprünglich neutralen Zustand ZnBChl rereduzieren kann, E_{ox} : Potential der Elektrode, bei dem Q durch Elektronabgabe an die Elektrode zu Q oxidiert wird, "hv an": Beginn der Lichteinstrahlung, "hv aus": Ende der Lichteinstrahlung);

Fig. 6 Detaillierte schematische Darstellung des Oberflächenhybrids $\text{Au-S}(\text{CH}_2)_2\text{-ds-oligo-Spacer-Q-ZnBChl}$ der **Fig. 5** mit Gold als Oberflächenmaterial, Mercaptoethanol als Spacer zwischen Elektrode und Oligonukleotid und die Darstellung der Sequenz der photoinduzierten Elektron-Transfer-Schritte. Das 12 Bp Probe-Oligonukleotid der exemplarischen Sequenz 5'-TAGTCGGAAGCA-3' ist, als Ausschnitt, im hybridisierten Zustand gezeigt.

Wege zur Ausführung der Erfindung

Eine Bildungseinheit einer exemplarischen Test-Site mit hybridisiertem Target, $\text{Au-S}(\text{CH}_2)_2\text{-ds-oligo-Spacer-UQ(RC)}$ der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-Einheit ist in **Fig. 4** dargestellt. Unter Bildungseinheit wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die kleinste sich wiederholende Einheit einer Test-Site verstanden. In dem Beispiel der **Fig. 4** ist die Oberfläche eine Gold-Elektrode. Die Verbindung zwischen Gold-Elektrode und Probe-Oligonukleotid wurde mit dem Linker $\text{HO}-(\text{CH}_2)_2\text{-S}$ aufgebaut, der mit der endständigen Phosphatgruppe am 3'-Ende zu $\text{P-O}-(\text{CH}_2)_2\text{-S-S}-(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$ verestert wurde und nach homolytischer Spaltung der S-S Bindung an der Gold-Oberfläche je eine Au-S Bindung bewirkte, womit 2-Hydroxymercaptoethanol und Mercaptoethanol-verbrücktes Oligonukleotid auf der Oberfläche koadsorbiert wurde. Die photoinduzierbar redoxaktive Einheit im Beispiel der **Fig. 4** ist das Reaktionszentrum (RC) der Photosynthese betreibenden Bakterien *Rhodobacter sphaeroides*, ein photoinduzierbar redoxaktives Protein bestehend aus Apoprotein und Cofaktoren. Im Anwendungsbeispiel ist das RC über seinen Cofaktor Ubichinon-50 (UQ) in der sogenannten Q_A -Bindungstasche des RCs kovalent mit dem Oligonukleotid verbunden, wobei zuerst freies UQ mit einer reaktiven Carbonsäuregruppe versehen wurde (siehe Beispiel 1), dann freies UQ über diese Carbonsäure-Gruppe kovalent an das Probe-Oligonukleotid angebunden wurde (Amidbildung unter Wasserabspaltung mit der terminalen Aminofunktion des an die C-5-Position des 5'-Thymins angebundenen $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ Linkers) und schließlich das restliche RC (Apoprotein mit allen Cofaktoren außer UQ) an UQ rekonstituiert wurde.

Wie weiter oben bereits erwähnt, kann die Modifikation der Probe-Oligonukleotide mit der kompletten oder mit einem Bestandteil der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit entweder vor oder nach der Bindung des Probe-Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche erfolgen. Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Schritte, die prinzipiell zur selben Bildungseinheit einer Test-Site führen, sollen im folgenden mit Hilfe der **Fig. 2** am Beispiel des Oberflächenhybrids $\text{Au-S}(\text{CH}_2)_2\text{-ss-oligo-Spacer-UQ(RC)}$ bzw. in seiner allgemeineren Form als Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-UQ(RC) dargestellt werden.

Das Probe-Oligonukleotid ist in der Nähe der beiden Enden jeweils über einen (beliebigen) Spacer mit (verschiedenen) reaktiven Gruppe versehen. In einer Reaktionssequenz "1" kann das so modifizierte Probe-Oligonukleotid in Gegenwart eines monofunktionalen Linkers (entsprechend den Punkten a)-c) und 2. im Abschnitt "Bindung eines Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche") gemeinsam mit dem monofunktionalen Linker kovalent an die Elektrode angebunden werden, wobei darauf geachtet wird, daß genügend monofunktionaler Linker geeigneter Kettenlänge zugesetzt

wird, um zwischen den einzelnen Probe-Oligonukleotiden genügend Freiraum für eine Hybridisierung mit dem Target-Oligonukleotid und für die Anbindung der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit zur Verfügung zu stellen. Danach wird an die freie, spacerverbrückte, reaktive Gruppe dem Probe-Oligonukleotids UQ, das vorher mit einer passenden reaktiven Kopplungsgruppe versehen wurde, angebunden. Die Anbindung erfolgt wie unter a) bzw. b) im Abschnitt "Bindung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer" beschrieben. Im letzten Schritt dieser Reaktionssequenz "1" wird dann das restliche RC (Apoprotein mit allen Cofaktoren außer UQ) an UQ rekonstituiert. In einer Variante dazu (Reaktionssequenz "2") kann das (mit Spacer und reaktiven Gruppen) modifizierte Probe-Oligonukleotid zuerst ohne freien, monofunktionalen Linker (Spacer) kovalent an die Elektrode gebunden werden, wobei es zu einer flachen Anlagerung des Oligonukleotids kommt. Danach wird der freie, monofunktionale Linker (Spacer) kovalent an die Elektrode gebunden. Eine weitere Möglichkeit (Reaktionssequenz "3") besteht darin, das (mit Spacer und reaktiven Gruppen) modifizierte Probe-Oligonukleotid zuerst mit UQ zu modifizieren, dann in Gegenwart von freiem, monofunktionalem Linker (Spacer) kovalent an die Elektrode anzubinden und anschließend mit dem restlichen RC zu rekonstituieren. Schließlich kann in einer Reaktionssequenz "4" das (mit Spacer und reaktiven Gruppen) modifizierte Probe-Oligonukleotid zuerst mit UQ modifiziert werden, um es dann mit dem restlichen RC zu rekonstituieren und anschließend kovalent an die Elektrode zu binden. Falls, wie im Fall des RCs, die photoinduzierbar redoxaktive Einheit einen wesentlich größeren Durchmesser aufweist als das hybridisierte ds-Oligonukleotid (größer als 30 Å), kann auf die kovalente Anbindung eines geeigneten freien, monofunktionalen Linkers (Spacers) an die Elektrode verzichtet werden, anderenfalls geschieht die Anbindung der Struktur -Spacer-ss-oligo-Spacer-UQ(RC) an die Elektrode in Gegenwart eines geeigneten, freien monofunktionalen Linkers.

Im Beispiel der Fig. 2 ist das RC über seinen Cofaktor Ubichinon-50 (UQ) in der sogenannten Q_A -Protein-Bindungstasche des RCs kovalent mit dem Oligonukleotid verbunden. Alternativ kann statt des UQ-Cofaktors in der Q_A -Bindungstasche auch ein anderer Cofaktor des RCs oder das Apoprotein kovalent an das Probe-Oligonukleotid angebunden werden, es können beliebige Kombinationen der Reaktionssequenzen "1", "2", "3" oder "4" in Fig. 2 angewandt werden, solange sie zum gleichen Endprodukt führen (vgl. Fig. 2) und es kann in beliebigen Reaktionsschritten statt des Einzelstrang-Probe-Oligonukleotids das mit komplementären, unmodifizierten (Target-)Oligonukleotid hybridisierte Probe-Oligonukleotid verwendet werden. Das Probe-Oligonukleotid kann auch direkt, also nicht über einen Spacer verbrückt, sowohl an die Elektrode als auch an die photoinduzierbar redoxaktive Einheit angebunden werden, wie unter c) im Abschnitt "Bindung eines Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche" bzw. a) im Abschnitt "Bindung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer" beschrieben.

Die elektrische Kommunikation zwischen der leitfähigen Oberfläche und der über ein Einzelstrang-Oligonukleotid verbrückten photoinduzierbar redoxaktiven Einheit in der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Einheit ist schwach oder gar nicht vorhanden. Durch Behandlung der Test-Site(s) mit einer zu untersuchenden Oligonukleotid-Lösung, kommt es, im Falle der Hybridisierung zwischen Probe und Target, zu einer verstärkten Leitfähigkeit zwischen der Oberfläche und der über ein Doppelstrang-Oligonukleotid verbrückten photoinduzierbar redoxaktiven Einheit. Für die Bildungseinheit der exemplarische Test-Site $Au-S(CH_2)_2$ -ds-oligo-Spacer-UQ(RC) (mit 12-Bp Probe-Oligonukleotiden) ist dies schematisch in Fig. 3 anhand amperometrischer Messungen gezeigt.

Durch Lichteinstrahlung geeigneter Wellenlänge auf das RC wird der Cofaktor P, der sogenannte primäre Donor, elektronisch angeregt und es kommt innerhalb der Cofaktoren des RCs zur photoinduzierten Ladungstrennung, wobei ein Elektron vom angeregten primären Donor P^* auf das UQ in der Q_A -Bindungstasche übertragen wird. Liegt an der Elektrode ein geeignetes Potential an, um vom reduzierten Ubichinon (UQ^-) ein Elektron auf die Elektrode zu übertragen, kommt es im Falle des nicht mit Target-Oligonukleotid hybridisierten Probe-Oligonukleotids trotzdem zu keinem Stromfluß, da die Leitfähigkeit des ss-Oligonukleotids in $Au-S(CH_2)_2$ -ss-oligo-Spacer-UQ(RC) sehr gering oder überhaupt nicht vorhanden ist. Im hybridisierten Zustand ($Au-S(CH_2)_2$ -ds-oligo-Spacer-UQ(RC)) jedoch ist die Leitfähigkeit hoch, ein Elektron kann von UQ^- zur Elektrode übertragen werden (unter Bildung von UQ) und bei Anwesenheit einer geeigneten redoxaktiven Substanz, die P^+ zu P reduziert, wird der Stromkreis geschlossen und weitere Lichtabsorption durch das RC startet den Zyklus erneut. Dies äußert sich amperometrisch in einem deutlichen Stromfluß zwischen Elektrode und photoinduzierbar redoxaktiver Einheit (Fig. 3). Damit ist es möglich, die sequenzspezifische Hybridisierung des Targets mit den Probe-Oligonukleotiden durch Amperometrie lichtinduziert zu detektieren. Die einzelnen Elektron Transfer Schritte, die im Oberflächenhybrid $Au-S(CH_2)_2$ -ds-oligo-Spacer-UQ(RC) durch Lichteinstrahlung und bei Anwesenheit einer geeigneten redoxaktiven Substanz zur Reduktion von P^+ zu P ausgelöst werden, sind in Fig. 4 dargestellt. Natürlich kann das Oberflächenhybrid $Au-S(CH_2)_2$ -ds-oligo-Spacer-UQ(RC) unter geeigneten äußeren Umständen und bei geeigneter Anbindung (z. B. Anbindung des RCs an das Probe-Oligonukleotid in der Nähe des primären Donors), auch umgekehrt geschaltet werden, so daß nach Lichteinstrahlung P^+ von der Elektrode reduziert und Q^- von einem geeigneten Oxidationsmittel oxidiert wird.

Eine weitere Test-Site $Au-S(CH_2)_2$ -ss-oligo-Spacer-Q-ZnBChl der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Einheit ist in Fig. 5 dargestellt. Durch Lichteinstrahlung geeigneter Wellenlänge auf ZnBChl wird ZnBChl elektronisch angeregt und es kommt zur photoinduzierten Ladungstrennung, wobei ein Elektron vom angeregten ZnBChl* auf das Chinon Q übertragen wird. Liegt an der Elektrode ein geeignetes Potential an, um vom so reduzierten Chinon (Q^-) ein Elektron auf die Elektrode zu übertragen, kommt es im Falle des nicht mit Target-Oligonukleotid hybridisierten Probe-Oligonukleotids trotzdem zu keinem Stromfluß, da die Leitfähigkeit des ss-Oligonukleotids in $Au-S(CH_2)_2$ -ss-oligo-Spacer-Q-ZnBChl sehr gering oder überhaupt nicht vorhanden ist. Im hybridisierten Zustand $Au-S(CH_2)_2$ -ds-oligo-Spacer-Q-ZnBChl jedoch ist die Leitfähigkeit hoch, ein Elektron kann von Q^- zur Elektrode übertragen werden (unter Bildung von Q) und bei Anwesenheit einer geeigneten redoxaktiven Substanz, die ZnBChl* zu ZnBChl reduziert, wird der Stromkreis geschlossen und weitere Lichtabsorption durch ZnBChl startet den Zyklus erneut. Dies äußert sich amperometrisch in einem deutlichen Stromfluß zwischen Elektrode und photoinduzierbar redoxaktiver Einheit (Fig. 5). Damit ist es möglich, die sequenzspezifische Hybridisierung des Targets mit den Probe-Oligonukleotiden durch Amperometrie lichtinduziert zu detektieren. Natürlich kann das Oberflächenhybrid $Au-S(CH_2)_2$ -ds-oligo-Spacer-Q-ZnBChl unter geeigneten äußeren Umständen und geeigneter Anbindung (z. B. $Au-S(CH_2)_2$ -ds-oligo-Spacer-ZnBChl-Q) auch

umgekehrt geschaltet werden, so daß nach Lichteinstrahlung ZnBChl^+ von der Elektrode reduziert und Q^- von einem geeigneten Oxidationsmittel oxidiert wird.

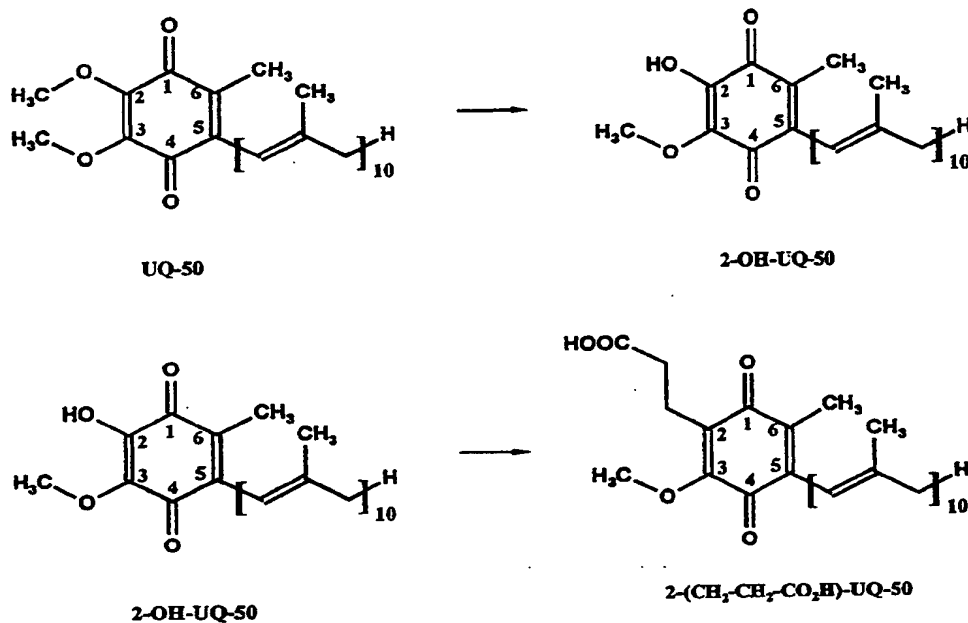
Da die Redoxaktivität der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit – auch bei passendem Elektrodenpotential – erst durch Lichteinstrahlung geeigneter Wellenlänge ausgelöst und maximal solange aufrechterhalten wird, wie die Lichteinstrahlung andauert, kann dies erfindungsgemäß dadurch ausgenutzt werden, daß ein bestimmtes Test-Site oder eine bestimmte Test-Site-Gruppe eines Oligomer-Chips räumlich aufgelöst wird, indem das Licht auf dieses Test-Site oder auf diese Test-Site-Gruppe begrenzt wird. Dies birgt den erfindungsgemäßen Vorteil, daß die verschiedenen Test-Sites (Nukleinsäure-Oligomer-Kombinationen) eines Oligomer-Chips auf eine gemeinsame, durchgängige, elektrisch leitende Oberfläche aufgebracht werden können und ein bestimmtes Test-Site oder eine bestimmte Test-Site-Gruppen einfach durch Anlegen eines geeigneten äußeren Potentials an die (gesamte) Oberfläche bei Lichteinstrahlung nur auf genau dieses Test-Site oder diese Test-Site Gruppe adressiert und amperometrisch detektiert werden kann. Die verschiedenen Test-Sites müssen also nicht auf einzelnen, elektrisch voneinander isolierten und zum Anlegen eines Potentials und Auslesen des Stroms einzeln ansteuerbaren (Mikro-) Elektroden aufgebracht werden.

Daneben können fehlerhafte Basenpaarungen (Basenpaar Mismatches) durch eine geänderte cyclovoltammetrische Charakteristik erkannt werden. Ein Mismatch äußert sich in einem größeren Potentialabstand zwischen den Strommaxima der Elektroreduktion und der Elektroreoxidation (Umkehrung der Elektroreduktion bei umgekehrter Potentialvorschubrichtung) bzw. der Elektrooxidation und Elektroreduktion in einem cyclovoltammetrisch reversiblen Elektronentransfer zwischen der elektrisch leitenden Oberfläche und der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit. Dieser Umstand wirkt sich vor allem in der amperometrischen Detektion günstig aus, da dort der Strom bei einem Potential getestet werden kann, bei dem zwar das perfekt hybridisierende Oligonukleotid-Target signifikant Strom liefert, nicht aber das fehlerhaft gepaarte Oligonukleotid-Target.

Beispiel 1

Modifikation des Ubichinon-50 mit einer Spacer-verbrückten reaktiven Carbonsäure-Gruppe

Die 2-Methoxy-Gruppe des Ubichinon-50 (UQ-50) wird durch Etherspaltung mit HBr, einer Standardmethode, zur 2-Hydroxygruppe modifiziert (alternativ kann 2-OH-UQ-50 nach dem Verfahren von Moore, H. W. and Folkers, K. Journal of the American Chemical Society, 1966, 88, 564–570 oder von Daves, G. et al., Journal of the American Chemical Society, 1968, 90, 4487–4493 hergestellt werden). Anschließend wird 2-OH-UQ-50 in einem Standardverfahren mit einer äquimolaren Menge an $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$ zum 2-($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$)-UQ-50 umgesetzt und chromatographisch aufgereinigt. Alternativ können 5-OH-6-alkyl-1,4-Benzochinon-Analoga des UQ-50 (Darstellung gemäß Catlin et al., Journal of the American Chemical Society, 1968, 90, 3572–3574) in einem Standardverfahren mit einer äquimolaren Menge an $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$ zu 5-($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$)-UQ-50-Analoga modifiziert werden.



Beispiel 2

Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ss-oligo-SpacerUQ(RC)}$

Die Herstellung von $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ss-oligo-Spacer-UQ(RC)}$ gliedert sich in 4 Teilabschnitte, nämlich der Darstellung der leitfähigen Oberfläche, der Derivatisierung der Oberfläche mit dem Probe-Oligonukleotid in Gegenwart eines geeigneten monofunktionalen Linkers (Inkubationsschritt), der kovalenten Anbindung des modifizierten Ubichinon-50 (Redoxschritt) und der Rekonstitution des restlichen RC's (Rekonstitutionsschritt).

Das Trägermaterial für die kovalente Anbindung der Doppelstrang-Oligonukleotide bildet ein ca. 100 nm dünner Gold-Film auf Mica (Muskovit Plättchen). Dazu wurde in einer elektrischen Entladungskammer frisch gespaltenes Mica mit einem Argon-Ionenplasma gereinigt und durch elektrische Entladung Gold (99.99%) in einer Schichtdicke von ca. 100 nm aufgebracht. Anschließend wurde der Gold-Film mit 30% H_2O_2 /70% H_2SO_4 von Oberflächenverunreinigungen befreit (Oxidation organischer Ablagerungen) und für ca. 20 Minuten in Ethanol getaucht, um an der Oberfläche adsorbierten Sauerstoff zu verdrängen. Nach Abspülen der Oberfläche mit bidestilliertem Wasser wird auf die horizontal gelagerte Oberfläche eine vorher bereitete 1×10^{-4} molare Lösung des (modifizierten) Doppelstrang-Oligonukleotids aufgetragen, so daß die komplette Gold-Oberfläche benetzt wird (Inkubationsschritt, siehe auch unten).

Zur Inkubation wurde ein doppelt modifiziertes 12 Bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-TAGTCG-GAAGCA-3' verwendet, das an der Phosphatgruppe des 3' Endes mit $(\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{S})_2$ zum P-O- $(\text{CH}_2)_2$ -S-S- $(\text{CH}_2)_2$ -OH verestert ist. Am 5'-Ende ist die endständige Base Thymin des Oligonukleotids am C-5 Kohlenstoff mit -CH=CH-CO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ modifiziert. Zu einer 2×10^{-4} molaren Lösung dieses Oligonukleotids in HEPES-Puffer (0,1 molar in Wasser, pH 7.5 mit 0,7 molarem Zusatz von TEATFB, siehe Abkürzungen) wurde ca. 10^{-4} bis 10^{-1} molar 2-Hydroxy-mercaptoethanol gegeben (oder ein anderer Thiol- oder Disulfid-Linker geeigneter Kettenlänge) und die Gold-Oberfläche eines Test-Sites komplett benetzt und 2–24 h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer P-O- $(\text{CH}_2)_2$ -S-S- $(\text{CH}_2)_2$ -OH des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer 1 : 1 Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Das in der Inkubationslösung gleichzeitig anwesende, freie 2-Hydroxy-mercaptoethanol wird ebenfalls durch Ausbildung einer Au-S Bindung koadsorbiert (Inkubationsschritt).

Die so mit einer Monolayer aus ss-Oligonukleotid und 2-Hydroxy-mercaptoethanol modifizierte Goldelektrode wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit einer Lösung von 3×10^{-3} molarem Chinon 2-(CH₂-CH₂-CO₂H)-UQ-50, 10^{-2} molarem EDC und 10^{-2} molarem sulfo-NHS in HEPES-Puffer (0,1 molar (in Wasser, pH = 7.5), benetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 1–4 h bilden der -CH=CH-CO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ Spacer und das 2-(CH₂-CH₂-CO₂H)-UQ-50 eine kovalente Bindung aus (Amidbildung zwischen der Aminogruppe des Spacers und der C-2-Säurefunktion des 2-(CH₂-CH₂-CO₂H)-UQ-50, Redoxschritt).

Anschließend wurde die so modifizierte Goldelektrode mit bidestilliertem Wasser gewaschen und mit einer Lösung von ca. 5×10^{-5} molarem Ubichinon-50-freien RCs in 10 mM Tris, pH = 8, mit 0,7 molarem Zusatz von TEATFB bei ca. 4°C für ca. 12 h inkubiert, um das restliche RC an das Oligonukleotid-gebundene UQ-50 zu rekonstituieren (Rekonstitutionsschritt).

Alternativ zur kovalenten Anbindung von 2-(CH₂-CH₂-CO₂H)-UQ-50 an das Probe-Oligonukleotid kann, unter gleichen Bedingungen, auch ein 5-(CH₂-CH₂-CO₂H)-UQ-50-Analogon (Beispiel 1) oder ein anderes, mit einer reaktiven Carbonsäure versehenes Chinon der Formel 1–8 verwendet werden, da auch an diese Ubichinon-50-freies RC rekonstituiert werden kann.

Beispiel 3

Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode Au-S(CH₂)₂-ss-oligo-Spacer-Q-ZnBChl

Die Herstellung von Au-S(CH₂)₂-ss-oligo-Spacer-Q-ZnBChl gliedert sich in 5 Teilabschnitte, nämlich der Darstellung der leitfähigen Oberfläche, der Derivatisierung der Oberfläche mit dem (mit Komplementärstrang hybridisierten) Probe-Oligonukleotid in Gegenwart eines geeigneten monofunktionalen Linkers (Inkubationsschritt), der kovalenten Anbindung des Elektron-Akzeptors (Akzeptorschritt), der kovalenten Anbindung des Elektron-Donors (Donorschritt) und der thermischen Dehybridisierung des Doppelstrang-Oligonukleotids (Dehybridisierungsschritt).

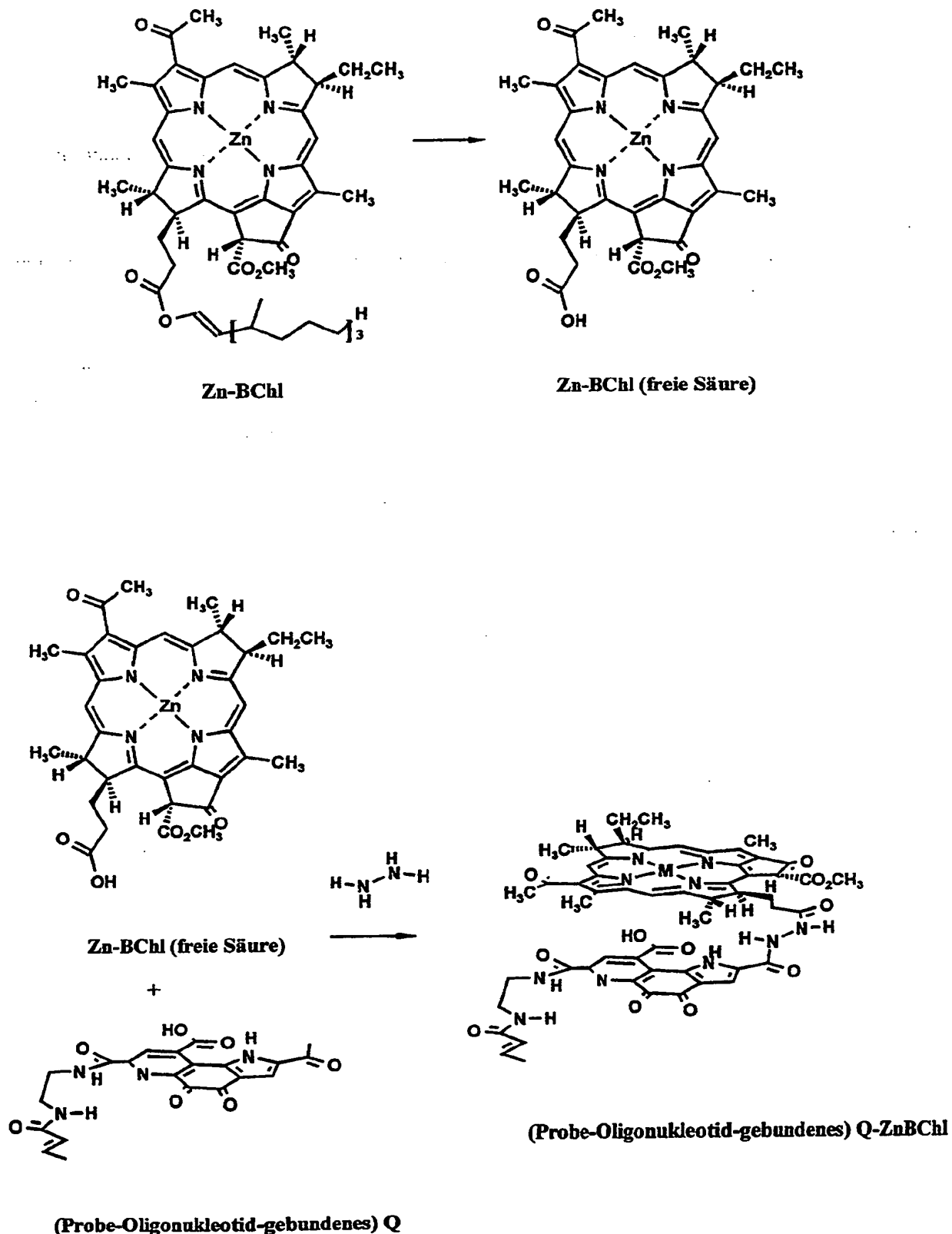
Das Trägermaterial für die kovalente Anbindung der Doppelstrang-Oligonukleotide, ein ca. 100 nm dünner Gold-Film auf Mica (Muskovit Plättchen), wurde wie in Beispiel 1 beschrieben, hergestellt.

Zur Inkubation wurde ein doppelt modifiziertes 12 Bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-TAGTCG-GAAGCA-3' verwendet, das an der Phosphatgruppe des 3'-Endes mit $(\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{S})_2$ zum P-O- $(\text{CH}_2)_2$ -S-S- $(\text{CH}_2)_2$ -OH verestert ist. Am 5'-Ende ist die endständige Base Thymin des Oligonukleotids am C-5 Kohlenstoff mit -CH=CH-CO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ modifiziert. Eine 2×10^{-4} molare Lösung dieses Oligonukleotids im Hybridisierungspuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5 mit 0,7 molarem Zusatz von TEATFB, siehe Abkürzungen) wurde mit einer 2×10^{-4} molaren Lösung des (unmodifizierten) komplementären Strangs im Hybridisierungspuffer bei Raumtemperatur für ca. 2 h hybridisiert (Hybridisierungsschritt). Nach der Hybridisierung wurde der nun 1×10^{-4} molaren Doppelstrang-Oligonukleotid-Lösung ca. 10^{-4} bis 10^{-1} molar 2-Hydroxy-mercaptoethanol (oder ein anderer Thiol- oder Disulfid-Linkers geeigneter Kettenlänge) zugesetzt, die Gold-Oberfläche eines Test-Sites komplett benetzt und 2–24 h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer P-O- $(\text{CH}_2)_2$ -S-S- $(\text{CH}_2)_2$ -OH des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer 1 : 1 Koadsorption des ds-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Das in der Inkubationslösung gleichzeitig anwesende, freie 2-Hydroxy-mercaptoethanol wird ebenfalls durch Ausbildung einer Au-S Bindung koadsorbiert (Inkubationsschritt).

Die so mit einer Monolayer aus ds-Oligonukleotid und 2-Hydroxy-mercaptoethanol modifizierte Goldelektrode wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit einer Lösung von 3×10^{-3} molarem Chinon PQQ, 10^{-2} molarem EDC und 10^{-2} molarem sulfo-NHS in HEPES Puffer benetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 1–4 h bilden der -CH=CH-CO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ Spacer und das PQQ eine kovalente Bindung (Amidbildung zwischen der Aminogruppe des Spacers und der C-7-Carbonsäurefunktion des PQQ, Akzeptorschritt).

Anschließend wurde die so modifizierte Goldelektrode mit bidestilliertem Wasser gewaschen und mit einer wässrigen Lösung aus 3×10^{-3} molarem Donor ZnBChl (freie Säure), $1,5 \times 10^{-1}$ molarem EDC, $2,5 \times 10^{-3}$ molarem Hydrazin-Monohydrat (NH₂-NH₂·H₂O) und 1×10^{-1} molarem Imidazol benetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 16 h bei 23°C bindet die C-1-Carbonsäurefunktion des an das Oligonukleotid gebundenen PQQ über Hydrazin an die freie Carbon-

säure-Gruppe des ZnBChl (Amidbildung zwischen den Aminogruppen des Hydrazins und der C-1-Carbonsäure-Gruppe des PQQ bzw. der freien Carbonsäure-Gruppe des ZnBChl, Donorschritt). Anschließend wurden die Doppelstränge bei Temperaturen von $T > 40^{\circ}\text{C}$ thermisch dehybridisiert und erneut mit bidestilliertem Wasser abgespült (Dehybridisierungsschritt). Das ZnBChl (freie Säure) wird aus Zn-BChl (Darstellung gemäß Hartwich et al., Journal of the American Chemical Society, 1998, 120, 3684–3693) durch Inkubation mit Trifluoressigsäure hergestellt.



Alternativ kann z. B. ZnBChl (freie Säure) über Esterbildung nach Standardverfahren auch an die 3-OH-Gruppe des 5'-terminalen Zuckers des Probe-Oligonukleotids gebunden werden oder der vorher kovalent verbundene Elektron-Donor/Elektron-Akzeptor-Komplex wird, wie im Donorschritt beschrieben, über eine freie Carbonsäure-Gruppe z. B. des Donors an das Probe-Oligonukleotid angebunden. Statt PQQ kann unter den gleichen Reaktionsbedingungen auch Anthrachinon-2,6-Disulfonsäure Dinatriumsalz im Akzeptorschritt verwendet werden. Bei Verwendung von PNA-Oligonukleotid mit z. B. $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-N(COCH}_2\text{-Base)-CH}_2\text{CO-}$ als Oligonukleotid-Baustein besteht eine alternative Anbindungsmöglichkeit der ZnBChl-PQQ-Einheit an das Nukleinsäure-Oligomer (PNA-Oligonukleotid) entsprechend d) im Abschnitt "Bindung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer". Dabei wird während der PNA-Oligonukleotid-Synthese statt der N-terminale Base in der Standard-PNA-Synthese-Reaktion PQQ über seinen Pyrrol-Stickstoff angebunden. Anschließend wird Zn-BChl, ähnlich wie im Donorschritt beschrieben, durch Inkubation des mit PQQ modifizierten PNA-Oligonukleotids mit 3×10^{-3} molarem ZnBChl (freie Säure), $1,5 \times 10^{-1}$ molarem EDC 10^{-2} und 2×10^{-1} molarem sulfo-NHS in HEPES Puffer an das Amino-Ende des Peptid-Rückgrats gebunden (Amidbildung zwischen der Aminogruppe des Rückgrats und der Carbonsäure-Gruppe des Zn-BChl (freie Säure)).

Patentansprüche

1. Durch kovalente Anbindung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer, **dadurch gekennzeichnet**, daß die photoinduzierbar redoxaktive Einheit ein oder mehrere Elektron-Donor-Moleküle oder -Molekülteile und ein oder mehrere Elektron-Akzeptor-Moleküle oder -Molekülteile enthält.
2. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die photoinduzierbar redoxaktive Einheit ein photoinduzierbar redoxaktiver, kovalent verknüpfter, wenigstens bimolekularer Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplex ist, wobei wenigstens zwei der Elektron-Donor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) und/oder Elektron-Akzeptor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) dieser photoinduzierbar redoxaktiven Einheit direkt durch eine oder mehrere kovalente Bindungen miteinander verbunden sind.
3. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 1, wobei wenigstens zwei der Elektron-Donor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) und/oder Elektron-Akzeptor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) durch einen oder mehrere verzweigte oder unverzweigte Molekülteile beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge kovalent verbunden sind.
4. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 3, wobei die verzweigten oder unverzweigten Molekülteile eine Kettenlänge von 1–20 Atomen, insbesondere 1–14 Atomen, aufweisen.
5. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die photoinduzierbar redoxaktive Einheit ein in ein oder mehrere Makromoleküle eingebetteter Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplex ist.
6. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die photoinduzierbar redoxaktive Einheit das native oder modifizierte Reaktionszentrum von Photosynthese betreibenden Organismen ist, insbesondere das native oder modifizierte Reaktionszentrum von Photosynthese betreibenden Bakterien.
7. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eines oder mehrere der Elektron-Donor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) Farbstoffe sind, insbesondere Flavine, (Metallo-)Porphyrine, (Metallo-)Chlorophylle oder (Metallo-)Bakteriochlorophylle bzw. Derivate davon.
8. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eines oder mehrere der Elektron-Akzeptor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) Flavine, Nikotinsäureamide oder Chinone sind, insbesondere Pyrrolo-Chinolin-Chinone (PQQ), 1,2-Benzochinone, 1,4-Benzochinone, 1,2-Naphthochinone, 1,4-Naphthochinone oder 9,10-Anthrachinone bzw. Derivate davon.
9. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die photoinduzierbar redoxaktive Einheit ein Charge-Transfer-Komplex ist.
10. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 9, wobei der Charge-Transfer-Komplex ein Übergangsmetall-Komplex ist, insbesondere ein Ru(II)-, ein Cr(III)-, ein Fe(II)-, ein Os(II)- oder ein Co(II)-Komplex.
11. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Nukleinsäure-Oligomer ein Desoxyribonukleinsäure-, Ribonukleinsäure-, ein Peptidnukleinsäure-Oligomer oder ein Nukleinsäure-Oligomer mit strukturell analogem Rückgrat ist.
12. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die photoinduzierbar redoxaktive Einheit kovalent alternativ an eine der Phosphorsäure-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppen oder an einen Zucker, insbesondere an eine Zucker-Hydroxy-Gruppe, des Nukleinsäure-Oligomer-Rückgrats gebunden ist.
13. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der Ansprüche 1–11, wobei die photoinduzierbar redoxaktive Einheit alternativ kovalent an eine Thiol-, Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe einer modifizierten Base des Nukleinsäure-Oligomers angebunden ist.
14. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktive Thiol-, Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe der Base kovalent über einen verzweigten oder unverzweigten Molekülteil beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge an die Base gebunden ist, wobei die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen der Thiol-, Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe und der Base ein verzweigtes oder unverzweigtes Molekülteil mit einer Kettenlänge von 1–20 Atomen, insbesondere von 1–14 Atomen, ist.
15. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der Ansprüche 12–14, wobei die photoinduzierbar redoxaktive Einheit an ein Ende des Nukleinsäure-Oligomer-Rückgrats bzw. an eine endständige, modifizierte Base angebunden ist.
16. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers, wobei eine ein oder mehrere Elektron-Donor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) und ein oder mehrere Elektron-Akzeptor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) enthaltende photoinduzierbar redoxaktive Einheit kovalent an ein Nukleinsäure-Oligomer angebunden wird.
17. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers nach Anspruch 16, wobei die photoinduzierbar redoxaktive Einheit durch kovalente Anbindung eines oder mehrerer Elektron-Donor-Molekül(e) oder

-Molekülteil(e) oder eines oder mehrerer Elektron-Akzeptor-Molekül(e) oder -Molekülteil(e) an ein Nukleinsäure-Oligomer angebunden wird.

18. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 16 oder 17, wobei die photoinduzierbar redoxaktive Einheit durch kovalente Anbindung eines oder mehrerer Makromoleküle bzw. durch kovalente Anbindung eines oder mehrerer Proteine an ein Nukleinsäure-Oligomer angebunden wird.

19. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers nach einem der Ansprüche 16–18, wobei das Nukleinsäure-Oligomer alternativ durch eine oder mehrere Amidbildungen mit Amin- oder mit Säure-Gruppen der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit, durch eine oder mehrere Esterbildungen mit Alkohol- oder mit Säure-Gruppen der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit, durch Thioesterbildung mit Thio-Alkohol- oder mit Säure-Gruppen der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit bzw. durch Kondensation einer oder mehrerer Amin-Gruppen des Nukleinsäure-Oligomers mit Aldehyd-Gruppen der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit und anschließender Reduktion der entstandenen Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung an die photoinduzierbar redoxaktive Einheit gebunden wird.

20. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers nach einem der Ansprüche 16–19, wobei an die photoinduzierbar redoxaktive Einheit kovalent eine oder mehrere verzweigte oder unverzweigte Molekülteile beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge angebunden ist und die verzweigten oder unverzweigten Molekülteile alternativ eine reaktive Amin-, Hydroxy-, Thiol-, Säure- oder Aldehyd-Gruppe zur kovalenten Anbindung an ein Nukleinsäure-Oligomer besitzen.

21. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers nach Anspruch 20, wobei die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen dem Nukleinsäure-Oligomer und der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit ein verzweigtes oder unverzweigtes Molekülteil mit einer Kettenlänge von 1–20 Atomen, insbesondere von 1–14 Atomen, ist.

22. Modifizierte leitfähige Oberfläche, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren gemäß den Ansprüchen 1 bis 15 an eine leitfähige Oberfläche angebunden sind.

23. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 22, wobei die Oberfläche aus einem Metall oder einer Metallegierung besteht, insbesondere einem Metall ausgewählt aus der Gruppe Platin, Palladium, Gold, Cadmium, Quecksilber, Nickel, Zink, Kohlenstoff, Silber, Kupfer, Eisen, Blei, Aluminium, Mangan und deren Mischungen.

24. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 22, wobei die Oberfläche aus einem Halbleiter besteht, insbesondere einem Halbleiter ausgewählt aus der Gruppe Kohlenstoff, Silizium, Germanium und α -Zinn.

25. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 22, wobei die Oberfläche aus einer binären Verbindung der Elemente der Gruppen 14 und 16, einer binären Verbindung der Elemente der Gruppen 13 und 15, einer binären Verbindung der Elemente der Gruppen 15 und 16, oder einer binären Verbindung der Elemente der Gruppen 11 und 17 besteht, insbesondere aus einem Cu(I)-Halogenid oder einem Ag(I)-Halogenid.

26. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 22, wobei die Oberfläche aus einer ternären Verbindung der Elemente der Gruppen 11, 13 und 16 oder einer ternären Verbindung Elemente der Gruppen 12, 13 und 16 besteht.

27. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach den Ansprüchen 22–26, wobei die Anbindung der modifizierten Nukleinsäure-Oligomere an die leitfähige Oberfläche kovalent oder durch Chemi- bzw. Physisorption erfolgt.

28. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach einem der Ansprüche 22–27, wobei alternativ eine der Phosphorsäure-, Carbonsäure-, Amin- oder eine Zucker-Gruppe, insbesondere eine Zucker-Hydroxy-Gruppe, des Nukleinsäure-Oligomer-Rückgrats kovalent oder durch Chemi- bzw. Physisorption an die leitfähige Oberfläche angebunden ist.

29. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach einem der Ansprüche 22–27, dadurch gekennzeichnet, daß alternativ eine Thiol-, Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe einer modifizierten Base des Nukleinsäure-Oligomers kovalent oder durch Chemi- bzw. Physisorption an die leitfähige Oberfläche angebunden ist.

30. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach den Ansprüchen 28 oder 29, wobei das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer über eine Gruppe am Ende des Nukleinsäure-Oligomer-Rückgrats bzw. über eine Gruppe einer endständigen, modifizierten Base an die leitfähige Oberfläche gebunden ist.

31. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach den Ansprüchen 22–30, wobei an die leitfähige Oberfläche verzweigte oder unverzweigte Molekülteile beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge kovalent oder durch Chemi- bzw. Physisorption angebunden sind und die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere kovalent an diese Molekülteile angebunden sind.

32. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 31, wobei die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen der leitfähigen Oberfläche und dem Nukleinsäure-Oligomer ein verzweigtes oder unverzweigtes Molekülteil mit einer Kettenlänge von 1–20 Atomen, insbesondere von 1–12 Atomen, ist.

33. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach den Ansprüchen 31 und 32, wobei der verzweigte oder unverzweigte Molekülteil alternativ an eine Phosphorsäure-, Carbonsäure-, eine Amin- oder eine Zucker-Gruppe, insbesondere eine Zucker-Hydroxy-Gruppe, des Nukleinsäure-Oligomer-Rückgrats oder eine Thiol-, Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe einer modifizierten Base des Nukleinsäure-Oligomers angebunden ist.

34. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 33, wobei der verzweigte oder unverzweigte Molekülteil an eine Phosphorsäure-, Zucker-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe am Ende des Nukleinsäure-Oligomer-Rückgrats bzw. eine Thiol-, Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe einer endständigen, modifizierten Base gebunden ist.

35. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche nach den Ansprüchen 22–34, wobei ein oder mehrere Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren gemäß den Ansprüchen 1–15 auf eine leitfähige Oberfläche aufgebracht werden.

36. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche nach Anspruch 35, wobei das Nukleinsäure-Oligomer oder das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomerstrang hybridisiert wird und in Form des Doppelstranghybrids auf die leitfähige Oberfläche aufgebracht wird.

37. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche nach den Ansprüchen 35 oder 36, wobei

das Nukleinsäure-Oligomer oder das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer in Gegenwart von weiteren chemischen Verbindungen, die ebenfalls an die leitfähige Oberfläche angebunden werden, auf die leitfähige Oberfläche aufgebracht wird.

38. Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Oligomer-Hybridisierungsereignissen, dadurch gekennzeichnet, daß eine leitfähige Oberfläche gemäß den Ansprüchen 22-34 mit Nukleinsäure-Oligomeren in Kontakt gebracht wird.

39. Verfahren zur elektrochemischen Detektion nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß die elektrochemische Detektion durch photoinduzierte Ladungstrennung in der über ein Nukleinsäure-Oligomer an die leitfähige Oberfläche angebundenen photoinduzierbar redoxaktive Einheit gestartet wird.

40. Verfahren zur elektrochemischen Detektion nach einem der Ansprüche 38 oder 39, wobei mehrere Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren gemäß den Ansprüchen 1-15 auf eine gemeinsame, durchgängige, elektrisch leitende Oberfläche aufgebracht werden.

41. Verfahren nach Anspruch 40, wobei die Lichteinstrahlung zur photoinduzierten Ladungstrennung in der über ein Nukleinsäure-Oligomer an die leitfähige Oberfläche angebundenen photoinduzierbar redoxaktive Einheit auf einen Bereich der leitfähigen Oberfläche mit einer oder mehreren modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren-Arten begrenzt wird.

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 38-41, wobei die Detektion cyclovoltametrisch, amperometrisch oder durch Leitfähigkeitsmessung erfolgt.

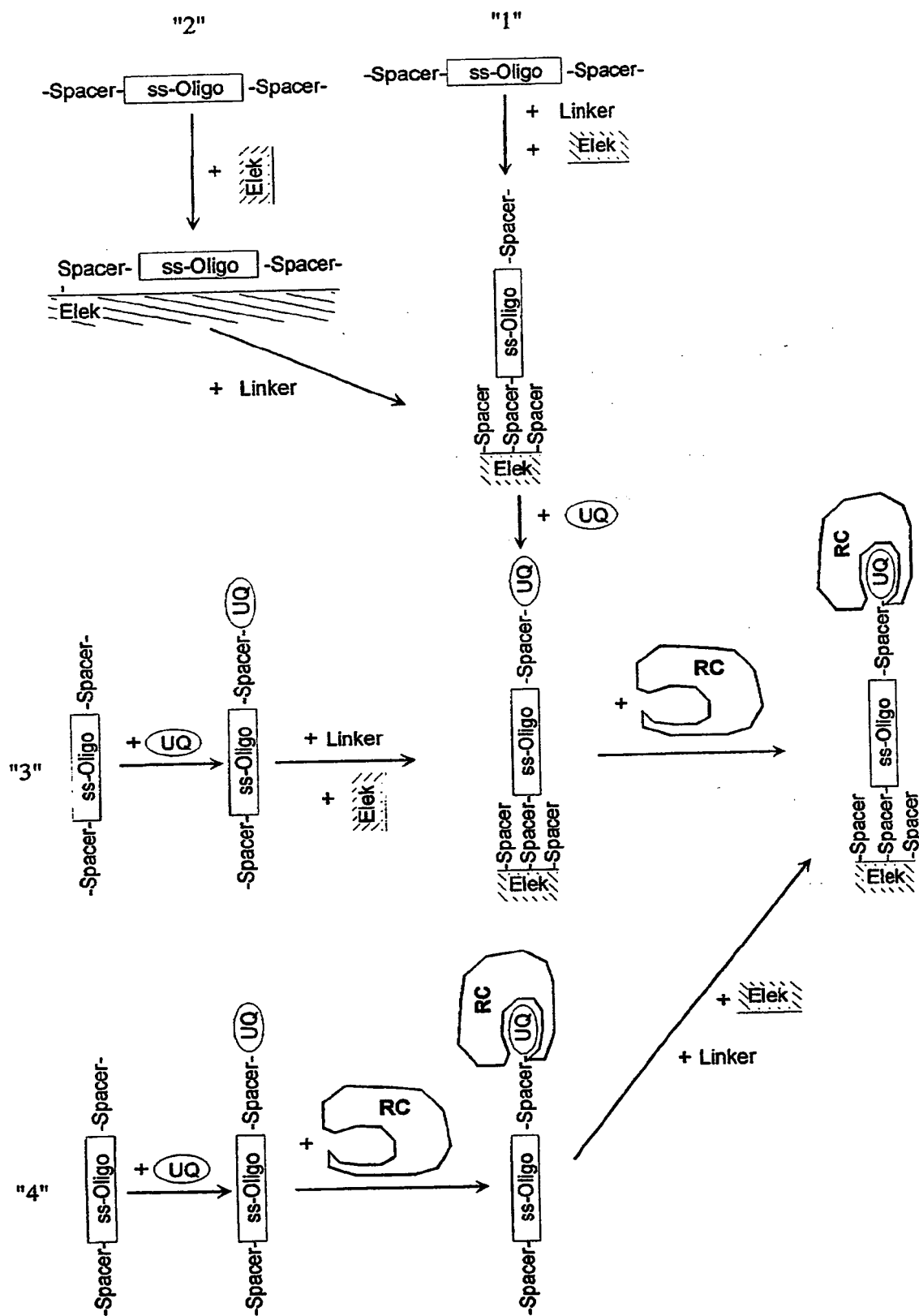
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 38-42, wobei das nach Einstrahlen von Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge gebildete oxidierte Elektron-Donor-Molekül oder -Molekülteil oder das gebildete reduzierte Elektron-Akzeptor-Molekül oder -Molekülteil der photoinduzierbar redoxaktiven Einheit durch eine geeignete, freie, nicht an das Nukleinsäure-Oligomer gebundene, aber mit dem Nukleinsäure-Oligomer in Kontakt stehende, redoxaktive Substanz, re-reduziert bzw. re-oxidiert, also jeweils in seinen ursprünglichen vor der Lichteinstrahlung vorhandenen Zustand, zurückversetzt werden kann.

44. Verfahren nach Anspruch 43, wobei die freie, nicht an ein Nukleinsäure-Oligomer gebundene, aber mit dem Nukleinsäure-Oligomer in Kontakt stehende, redoxaktive Substanz bei einem Potential ϕ selektiv oxidierbar und reduzierbar ist, wobei ϕ der Bedingung $2,0 \text{ V} \geq \phi \geq -2,0 \text{ V}$, gemessen gegen Normalwasserstoffelektrode, genügt.

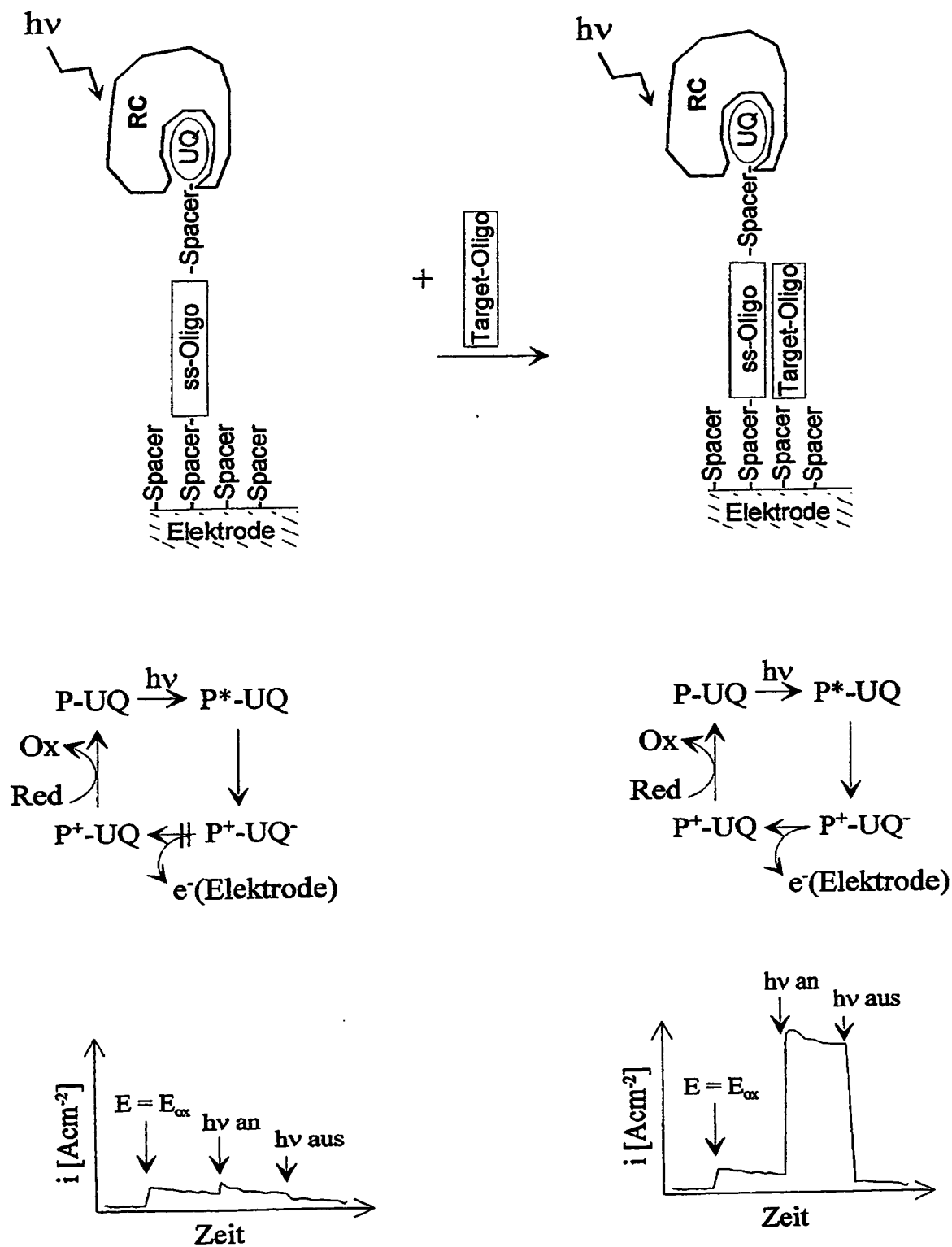
45. Verfahren nach Anspruch 43 oder 44, wobei die freie, nicht an ein Nukleinsäure-Oligomer gebundene, aber mit dem Nukleinsäure-Oligomer in Kontakt stehende, redoxaktive Substanz ein freies Chinon, ein freier Hexacyanoferrat(II)-Komplex, ein freies Natriumascorbat, ein freier Ru(II)hexamin-Komplex oder ein freies redoxaktives Protein, insbesondere ein freies Cytochrom, ist.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

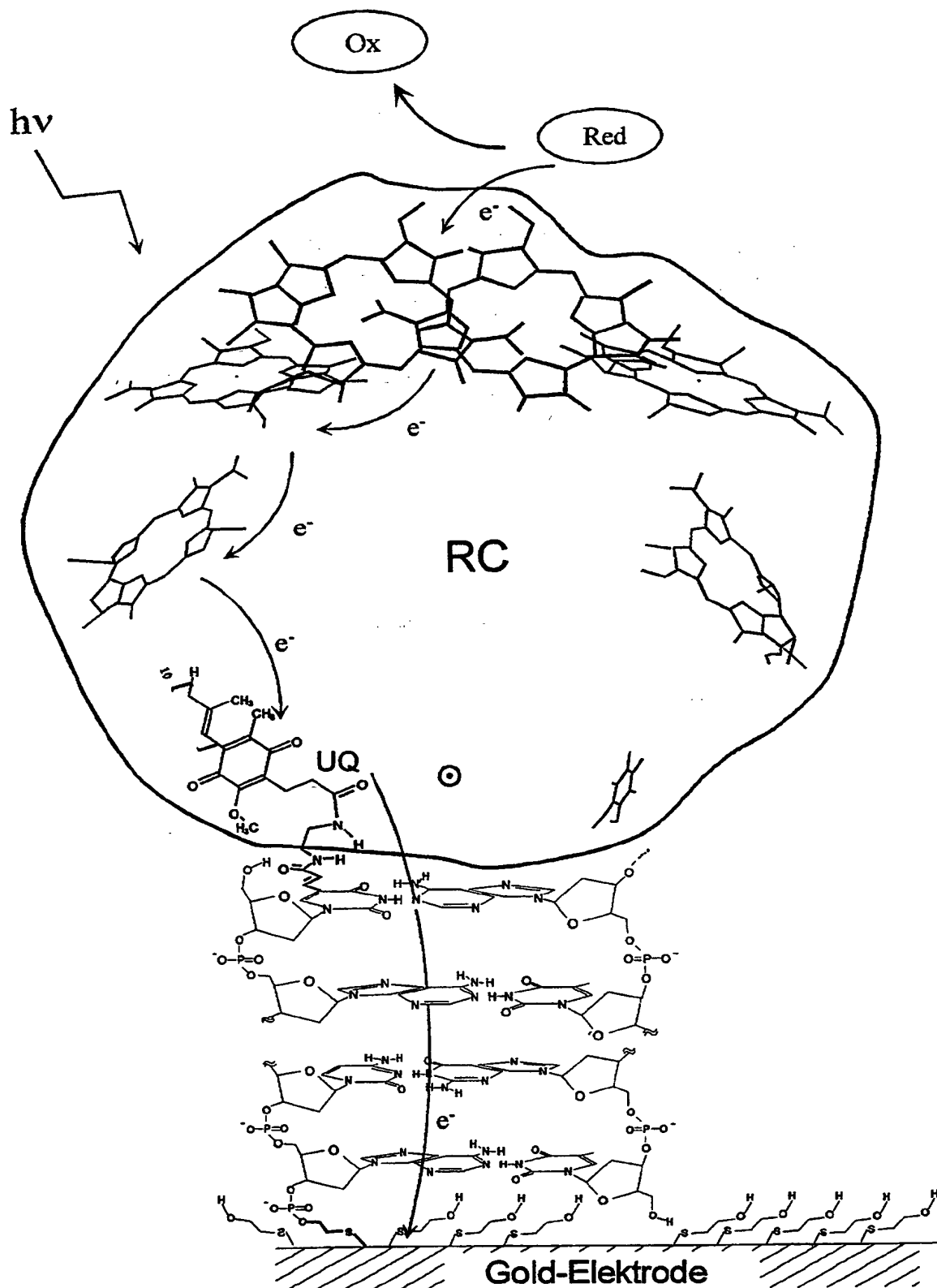
Figur 2



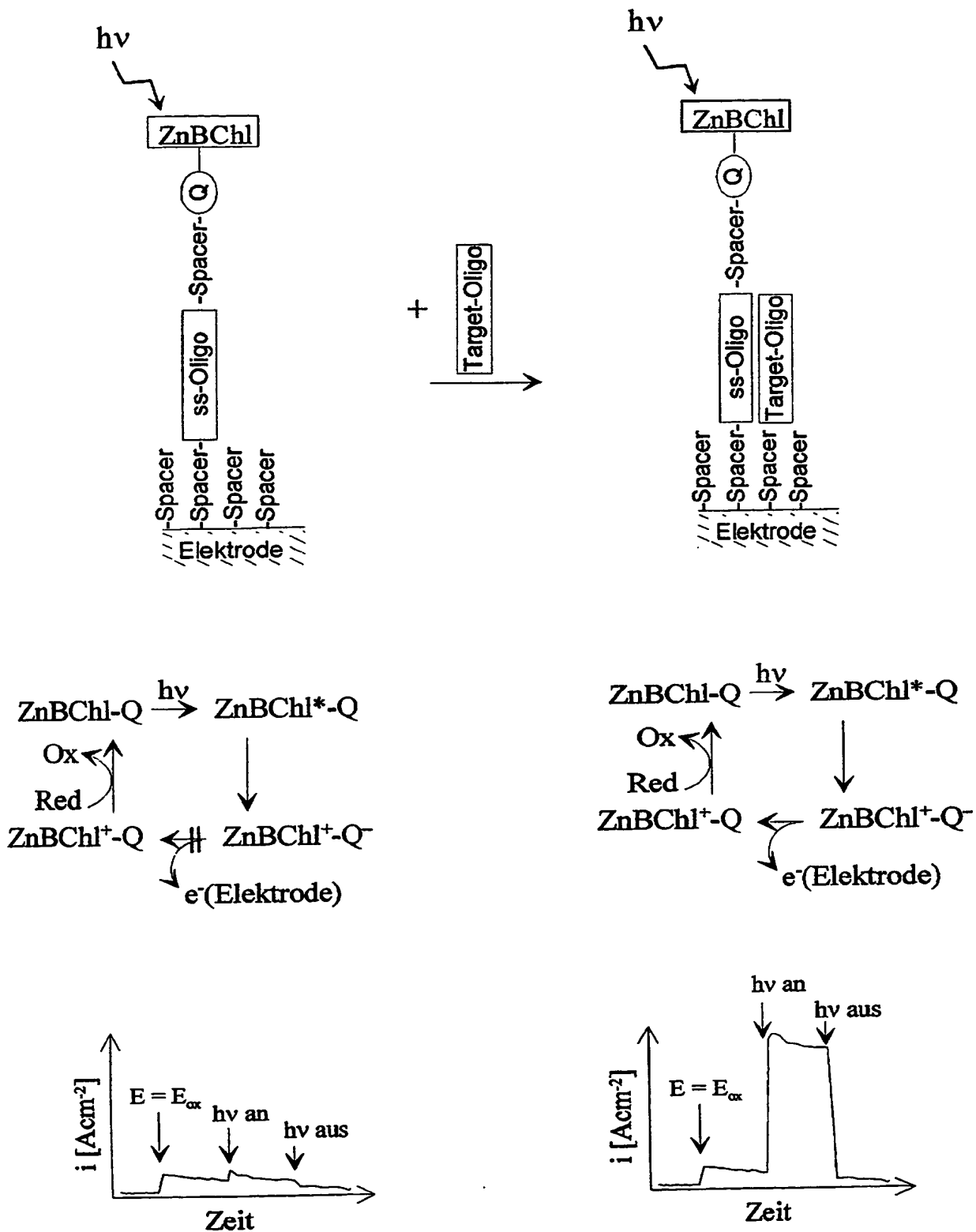
Figur 3



Figur 4



Figur 5



Figur 6

